Über Polypeptide der 2-Aminoisobuttersäure

Inauguraldissertation
der philosophischen Fakultät II der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

ERICH SCHNEITER
von Amsoldingen

Von der philosophischen Fakultät II auf Antrag des Herrn Prof. Dr. R. Signer angenommen.

Bern, den 31. Oktober 1940.

Der Dekan:
Prof. W. Scherer.

Über Polypeptide der 2-Aminoisobuttersäure

Inauguraldissertation
der philosophischen Fakultät II der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

ERICH SCHNEITER

von Amsoldingen

Von der philosophischen Fakultät II auf Antrag des Herrn Prof. Dr. R. Signer angenommen.

Bern, den 31. Oktober 1940.

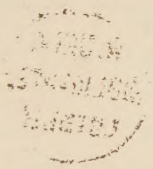
Der Dekan:
Prof. W. Scherer.

Photomechanische Reproduktion Schüler A. G. Biel · 1941

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die vorliegende Arbeit wurde im chemischen Institut der Universität Bern unter Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Signer ausgeführt. Meinem sehr verehrten Lehrer danke ich für seine wertvollen Ratschläge und das grosse Interesse, das er stets meiner Arbeit entgegenbrachte.



I N H A L T S U E B E R S I C H T .

	Seite
Einleitung	1
Uebersicht über Direktsynthesen höherer Peptide	3
Ausgangssubstanzen	9
1. 2-Aminoisobuttersäure (= Amib) (Biologisches, Darst., Eigg.)	9
2. 2-Aminoisobuttersäure-äthylester (Darst., Eigg.)	15
3. 2-(Carbomethoxyamino)-isobuttersäure (Darst., Eigg.)	16
4. 2-Aminoisobutter-N-carbonsäureanhydrid (Darst., Eigg.)	18
5. 3-6-Dioxo-2-2-5-5-tetramethylpiperazin (Darst., Eigg.)	22
Polykondensationsversuche	28
1. Erhitzen von Amib* und ihrem Ester in offenen & geschlossenen Röhren	28
Allgemeines	28
Versuche in offenen Gefässen	30
Versuche in geschlossenen Röhren	32
2. Erhitzen von Amib mit Essigsäureanhydrid	36
3. Peptide aus 2-Aminoisobutter-N-carbonsäureanhydrid	40
Allgemeines	40
Darstellung	44
1. Allgemeines	44
2. Verhalten beim Zutritt von Luftfeuchtigkeit	45
3. Veränderung in H_2O	47
4. Rasches Erhitzen	47
5. Langsames Erhitzen	49
Hydrolytischer Abbau	57
Löslichkeitsverhalten	58
Röntgenuntersuchungen	61
Zusammenfassung	62
Literatur	63

*Abkürzung: Amib = 2-Aminoisobuttersäure.

EINLEITUNG.

Ueber das kolloidchemische Verhalten der Eiweisstoffe sind in jüngster Zeit wichtige neue Erkenntnisse zu Tage gefördert worden. Während früher z. B. Fodor[1] daraus noch folgerte, dass Proteine polydispers sein müssten*, fanden nun Svedberg[2] und Mitarbeiter auf Grund ultrazentrifugaler Messungen, dass die nativen, löslichen Proteine in Lösung vielmehr mono- oder höchstens paucidispers sind. Aber noch weitere Eigentümlichkeiten sind mit Hilfe der Ultrazentrifuge aufgedeckt worden. So hat sich herausgestellt, dass die Molekulargewichte dieser Proteine sehr häufig geradzahlige Multipla eines Grundmolekulargewichtes von 17 600 sind. Andererseits sind die einzelnen Vertreter etwa durch p_H-Aenderungen oder Zugabe von Salzen zu kleineren, geradzahligen Einheiten aufspaltbar. Dabei liegt der Maximalwert des Molekulargewichtes im isoelektrischen Punkt.

Wie sind nun diese Erscheinungen aus der Konstitution deutbar? Hierzu muss gesagt werden, dass die Konstitution der Eiweisstoffe noch weitgehend ungeklärt ist und mit den üblichen Methoden auch nur schwierig weiter aufklärbar sein dürfte wegen der grossen Komplikation der Bausteine[3]. Man muss deshalb nach neuen Möglichkeiten suchen, welche es trotzdem erlauben das oben erwähnte kolloidchemische Verhalten verständlich zu machen. Ein Weg hierzu wird darin bestehen, dass man Proteine zu hemikolloiden Zwischenprodukten abbaut oder hemikolloide Peptide aufbaut, wobei jedesmal die Kolloideigenschaften der Zwischenprodukte zu untersuchen sind. Eine solche Forschungsrichtung ist analog zu derjenigen, welche von Staudinger und seiner Schule mit Erfolg bei Zellulose, Kautschuk und synthetischen Hochpolymeren angewandt wurde.

*Als Beweis für diese Auffassung galt der Befund des Minimums an elektrischer Ladung bei einem Maximum an Hydratation im isoelektrischen Punkt.

Während im hiesigen Institut einerseits Mosimann[4] hemikolloide Zwischenprodukte der Gelatine untersuchte, bildeten anderseits Aufbau und Untersuchungen hemikolloider Peptide das Ziel der Arbeiten Bielsers[5] und der vorliegenden. Zu letzterem Zwecke musste erst ein Weg zur Herstellung höhermolekularer Peptide gefunden werden. Nun ist aber schon der Aufbau niederer Peptide mit grossen Schwierigkeiten verbunden. So erwies sich die bisher von Curtius[6], E. Fischer[3], Abderhalden[8] u.a.[9] angewandte stufenweise Aneinanderkettung von Aminosäuren in ihrer quantitativen Durchführung so mühsam und wenig ergiebig, dass nur Peptide mit verhältnismässig geringen Kettenlängen hergestellt werden konnten. Es scheint, dass vorläufig eine Synthese höhermolekularer Peptide auf diese Weise nicht zu verwirklichen ist.

Zur Gewinnung von Hochpolymeren hat aber ein anderer Weg viel grösseren Erfolg gebracht, nämlich derjenige der direkten Polymerisation, bzw. Polykondensation. Darnach gelang es nicht nur Kunststoffe wie etwa Polyoxymethylen aus Formaldehyd, sondern sogar den Naturstoff Kautschuk aus Isopren herzustellen. Aber Aminosäuren sind keine homöopolaren Substanzen wie etwa Isopren. Sie zeigen daher ein komplizierteres Verhalten. Trotzdem könnten sie oder ihre Derivate unter geeigneten Umständen direkt polykondensieren, bzw. polymerisieren (s. später).

Verwendet man nur eine Aminosäure als Ausgangssubstanz, so werden am ehesten leicht überblickbare Substanzen zu erhalten sein. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit versucht nur die 2-Aminoisobuttersäure, bzw. deren Derivate, direkt in hochpolymere Peptide zu verwandeln. Diese ist chemisch einfach bestimmbar, zeigt keine optische Aktivität und ergibt keine enolisierbaren Peptide.

UEBERSICHT UEBER DIREKTE SYNTHESEN HOEHERER PEPTIDE.

Hochmolekulare Produkte können direkt entweder durch Polymerisation oder durch Polykondensation aus monomeren Molekülen hergestellt werden. Je nach Reaktionsbedingungen (Anregung, Katalysatoren etc.) und der Zahl der reaktionsfähigen Gruppen in den monomeren Molekülen entstehen, nach Dreher,[10] fadenförmige, offen verzweigte, fadenförmig vernetzte oder ringförmige Moleküle. Aminosäuren bilden nun Ausgangsstoffe mit mehreren reaktionsfähigen Gruppen im Molekül. Asparagin etwa könnte daher alle obgenannten Molekülformen geben, während Monoaminomonocarbonsäuren nur Faden- oder Ringformen liefern werden. Tatsächlich führt bei letzteren schon die erste Stufe der Verkettung sowohl zum Dipeptid als auch zum ringförmigen Diketopiperazin. Dabei ist der zweite Reaktionsgang unerwünscht, weil die Kette vorzeitig abgebrochen wird. Er kann aber mehr oder weniger in den Vordergrund treten. So kondensieren z.B. Glykokoll leicht[5], Alanin schwierig[11] und 2-Aminoisobuttersäure kaum zu höhermolekularen Peptiden. Dafür entsteht beim ersten wenig, beim zweiten beträchtlich und beim dritten vorwiegend Diketopiperazin.

Aminosäuren selbst können nur polykondensieren. Falls es jedoch gelänge z.B. einen stabilen Ring von der Form $R_1R_2{:}C\!\!<\!\!\begin{matrix}C{=}O\\ NH\end{matrix}$ herzustellen, so wäre auch eine Polymerisation möglich.

Im Gegensatz zum stufenweisen Aufbau werden bei solchen Reaktionen nicht einheitliche Peptide, sondern Mischungen Polymerhomologer erhalten. Während man aber die stufenweise Synthese von Polypeptiden mit systematisch geleiteten Versuchen verbesserte und erweiterte, sind direkte Synthesen meist durch Zufall gefunden worden. Vielfach teilten die Autoren nebenbei mit, dass sie ausser der erwarteten Verbindung eine zweite erhalten hätten, welche wahrscheinlich eine "höhermolekulare Substanz" sei. Zur genaueren Erforschung wurden die so entstandenen Polypeptide nur selten herangezogen.

Das Ergebnis war wegen ihrer Wasserunlöslichkeit und Unschmelzbarkeit dürftig, so dass oft der Schwerpunkt einer Arbeit auf andersartige Verbindungen hinübergeschoben wurde.[12] Im Folgenden sind nun in der Literatur gefundene Kondensationen von Aminosäuren oder deren Derivaten kurz zusammengestellt. Versuche, welche als Ausgangspunkte für die eigenen Arbeiten dienten, werden später eingehender besprochen.

A. Kondensationen von 2-Aminosäuren* zu höhermolekularen Peptiden.

1. Beim Erhitzen von Glykokoll mit Glyzerin in offenen und geschlossenen Gefässen erhielten Maillard,[13] Balbiano und Trasciati[11], ferner Bielser[5] Glykokollpeptide. Maillard gewann je nach Mischungsverhältnis, Temperatur und Erhitzungsdauer im offenen Gefäss mehr Diketopiperazin oder mehr Peptide, letztere bis zu einem wahrscheinlichen Polymerisationsgrad von 15. Bei der Hydrolyse entstand wieder Glykokoll. Balbiano und Trasciati bestätigten diese Befunde. Sie versuchten auch andere Stoffe zuzusetzen, etwa Naphtalin, das beim Erhitzen mit Glykokoll Produkte ergab, deren Abtrennung nicht gelang. Vergeblich wurde eine Wirkung von Glyzerin auf Alanin versucht.[11] Asparagin dagegen spaltete unter denselben Bedingungen NH_3 ab unter Bildung von wenig amorpher Substanz. Blanchtière[14] erhitzte ferner Glutaminsäure mit Glyzerin + H_2O im Wasserstoffstrom auf 150°. Dabei bildete sich aber nur ein zyklisches Tripeptid.

2. Während Kohler und Preu[15] beim blossen Kochen von Leucin und Alanin mit HCl nur Leucinimid, bzw. Laktimid erhielten, gewann Schaal[16] nach tagelangem Erhitzen von Asparaginsäurechlorid auf 200° im CO_2-Strom Oktaspartidanhydrid. Schiff[17] erhitzte die Asparaginsäure selbst. Nach 20 Stunden hatte sich hauptsächlich Oktaspartid neben Tetraspartid gebildet. Beim Auskochen des Rohproduktes mit H_2O fand er in der überstehenden Lösung Oktaspartsäure.

*Auch andere Aminocarbonsäuren kondensieren u.U. zu Höherpolymeren (z.B. 6-Aminocapronsäure, Am. Pat. Nr. 2071253)

3. Werden Aminosäuren mit Essigsäureanhydrid[18] erhitzt, so entstehen in der Regel die erwarteten N-azetylierten Aminosäuren und durch weitere Kondensation Laktone (Azlaktonverfahren von Bergmann)[19]. Daneben können sich aber auch, je nach der angewandten Aminosäure, der Konzentration an Essigsäureanhydrid und der Erhitzungsdauer, andersartige Kondensationsprodukte bilden. So erhielten Mohr und Geis[20] aus 2-Aminoisobuttersäure nur wenig Lakton beim Abdestillieren der gewonnenen Lösung. Die Hauptmenge war im Kolben zurückgeblieben, wurde aber nicht näher untersucht. Levene und Steiger[21] setzten diese Untersuchungen fort. Es gelang ihnen dabei unlösliche Anteile zu gewinnen, welche sie als komplexe, höhermolekulare Kondensate der 2-Aminoisobuttersäure ansahen. Ausser Elementaranalysen fehlen jedoch weitere Angaben. R. Steiger[22] beschäftigte sich später wieder mit der Azetylierung dieser Aminosäure und ihrem einfach N-methylierten Derivat, erwähnt aber keine unlöslichen Produkte. Endlich erhielt Bergmann[23] beim kurzen Erwärmen von Azetyl-dl-Histidin mit Essigsäureanhydrid unlösliche Anteile, welche auch nicht näher untersucht wurden. Was für Kondensate hier entstehen, ist aus den dürftigen Angaben nicht ersichtlich. Dass keine positiven Biuretreaktionen erwähnt werden, lässt besetzte N-H-Gruppen vermuten.

4. Parallel mit der leichten Gewinnung von Peptiden aus Glykokoll scheint auch diejenige von Benzoyl-pentaglycyl-glycin zu gehen durch Einwirkung von Azetyl- oder Benzoylchlorid auf Glykokollsilber.[24] Dasselbe Endprodukt wird erhalten beim Erhitzen von Glykokoll mit Hippursäureäthylester auf 180°; stärkeres Erhitzen führt zu weitgehender Zersetzung. Längere Glycylketten scheinen auf diese Art nicht zu entstehen.

B. Kondensationen von 2-Aminosäurederivaten zu höhermolekularen Peptiden.

1. Bergmann[17] gelang es "übermolekulare Diketopiperazine" herzustellen. Dabei war allerdings die Gegenwart einer OH- (Serin) oder einer SH- (Cystein) oder einer -SS-Gruppe (Cystin) nötig. Sie verhielten sich ähnlich wie hoch-

molekulare Stoffe. Aus ihnen liessen sich Tetrapeptide gewinnen.

2. Während die Aminosäureester beim Aufbewahren unter Wasserausschluss, am raschesten aber durch Erhitzen im Rohr auf 180°, in Anhydride übergehen, zeigt der Glykokollester ein anderes Verhalten. Er verwandelt sich nämlich nur teilweise in Diketopiperazin, die Hauptmenge bildet eine von Curtius als Biuretbase bezeichnete Substanz.[26] Das Verhältnis von Biuretbase zum Diketopiperazin variiert dabei je nach Lösungsmittel und Aufbewahrung des Esters. Ihre Konstitution suchten nacheinander Lilienfeld,[27] Schwarzschild[28] und Curtius[29] aufzuklären. Nach letzterem besteht sie hauptsächlich aus Triglycyl-glycinester. Kondensate bis Eicosa-glycyl-glycinester erhielt in letzter Zeit Fränkel.[30] Er liess dazu den Ester längere Zeit stehen oder erhitzte ihn auf 100°. Letzteres steht auch mit älteren Angaben[26,31] im Einklang, wonach die Biuretbase beim Erhitzen mit H_2O weiterkondensiert. Endlich glaubt Pascu[32] nach sechstägigem Erhitzen des Hexapeptidesters auf 130° sogar einen 96-Peptidester erhalten zu haben.

3. Meyer[33] versetzte Glykokollmethylester in der Wärme mit kleinen Mengen N-acethyl-glykokollmethylester, beobachtete aber dabei nur ein Tripeptid.

4. Lilienfeld[27] kondensierte auch Leucin- und Tyrosinester mit Glykokollester, wobei er peptonähnliche Körper gewann. Aehnliche Substanzen stellte auch E. Fischer[34] aus Aminosäuren + Peptidestern her. Dipeptidester scheinen ebenfalls beim Erhitzen kondensierbar zu sein.

5. Auch Carbamate von Aminosäureestern kondensieren beim Erwärmen.[35]

6. Die relativ bestuntersuchten Direktkondensate sind diejenigen, welche aus 2-Amino-N-carbonsäureanhydriden gebildet wurden. Leuchs,[36-38] welcher als erster solche Anhydride darstellte, beobachtete an ihnen merkwürdige Eigenschaften. So veränderte sich z.B. Glykokoll-N-carbonsäureanhydrid beim Lösen in Wasser von 15° unter Abspaltung von CO_2 zu Glykokoll, jedoch nicht beim Lösen in Eiswasser. Wurde es nur mit wenig Wasser verrieben, so entstand unter

CO_2-Entwicklung ein in H_2O unlöslicher Körper. Ein solcher bildete sich auch, wenn das Anhydrid mit H_2O oder Alkohol gekocht wurde. Beide waren amorph und in keiner Weise zu reinigen. Sie gaben positive Biuretreaktionen. Ihre Elementarzusammensetzung war fast gleich derjenigen des Glykokolldiketopiperazins. Den Reaktionslauf stellte daher Leuchs folgendermassen dar:

$n\ \overbrace{CO\text{—}N\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}O} \longrightarrow (\overbrace{CO\text{-}CH_2\text{-}N})_n + n\ CO_2$ (praktisch etwa 99%ige CO_2-Abspaltung). Nach Feststellungen von Meyer und Go[33] bilden sich dabei Polyglycine bis zu einem Molekulargewicht von etwa 2000.

In der Folge wurde eine Anzahl solcher 2-Amino-N-carbonsäureanhydride von Curtius,[39] Wessely[12,40-45] und Freudenberg[46] hergestellt und an ihnen analoges chemisches Verhalten festgestellt. Besonders Wessely bemühte sich um diese Verbindungen. Aber auch sein Interesse liess bald einmal nach, waren doch wegen der Schwerlöslichkeit der Kondensate viskosimetrische, osmometrische, ultrazentrifugale etc. Messungen undurchführbar. Immerhin sind auf diesem Wege mit guten Ausbeuten höhermolekulare Peptide erhalten worden.

C. Gemeinsame Polykondensationen von Aminosäuren mit andern Verbindungen.

Die nachstehend zusammengestellten Angaben sollen zeigen, dass bei Einwirkung verschiedener Stoffe auf Aminosäuren ebenfalls Polykondensate auftreten können.*

1. Beim Erhitzen von Asparaginsäureanhydrid mit Harnstoff[49] auf 130° entstand eine viskose Masse, deren Konstitution von H. Schiff[50] als Polyasparaginsäureureid mit 2 Molekülen Harnstoff und 8 Molekülen Asparaginsäure bestimmt wurde.

2. Schützenberger[51] erhitzte eine Mischung von Leucin, Leucein und 10% Harnstoff mit P_2O_5. Er erhielt eine viskose Masse, die wasserlöslich war und Eiweissreaktionen gab. Ihre Struktur wurde aber nicht näher untersucht.

*So auch Methacrylderivate[47] aus 1-Br-isobuturylchlorid + Aminosäure und darauffolgende Aminierung. Ferner nicht weiter untersuchte Produkte aus Aminosäurenitrilen + Ammoniumcarbonat.[48]

D. Beobachtungen über die Bildung hochmolekularer Produkte bei der Hydrolyse von Eiweisstoffen.

1. Am längsten bekannt sind die beim Säureabbau der Proteine auftretenden höhermolekularen Huminsubstanzen.[52] Sie entstehen wahrscheinlich durch sekundäre Umwandlung einzelner Aminosäuren, wie Tryptophan, Tyrosin und Lysin. Aus den Abbauprodukten gehen ferner durch Einwirkung von Kohlehydraten auf Aminosäuren, bzw. Peptide, Melanoidine[53] hervor. Auch darüber sind Untersuchungen gemacht worden, doch konnte ihre chemische Struktur noch nicht geklärt werden. Einfache Melanoidine gelang es zu synthetisieren.

2. Engelang[54] hydrolysierte Kasein mit HCl und methylierte dann die entstandenen Produkte erschöpfend mit Methyljodid. Arbeitete er dabei unter Druck und bei erhöhter Temperatur, so entstanden "sehr merkwürdige Körper, z.T. offenbar Polykondensate". Diese wurden nicht weiter untersucht.

3. Nicht viel übersichtlichere Produkte gewann Fodor, als er Gelatine mit Essigsäureanhydrid[55] oder mit Glyzerin[56] unter Erhitzen abzubauen versuchte. Dabei sollen neben niederen Peptiden und Aminosäuren auch höhermolekulare Anteile entstanden sein. Auf Grund von Paralleluntersuchungen mit Gelatinepepton scheint es, als ob zuerst Abbau und sekundär wieder Kondensation eintrat. Wurde nämlich ein Pepton vom mittleren Molekulargewicht 400 analog mit Essigsäureanhydrid behandelt, so entstand ein Produkt vom mittleren Molekulargewicht 1500. Fodor glaubt, dass ein einzelnes "Peptonmolekül" erst azetyliert und hierauf sekundär in verschieden hohem Grade kondensiert wird.

4. Endlich glaubte Vögtlin,[57] dass beim Belüften einer teilweise durch Proteinase abgebauten Proteinlösung wieder Synthesen stattfinden. Diese Ansicht wurde aber durch Versuche von Strain und Linderström-Lang[58] widerlegt.

A U S G A N G S S U B S T A N Z E N .

1. 2-Aminoisobuttersäure* $(CH_3)_2:C(NH_2).COOH$

Biologisches.

Ob die Amib* unter den Eiweisspaltstücken vorkommt, ist heute noch nicht sicher abgeklärt. Dabei ist es gar nicht einfach sie von der isomeren n-Aminobuttersäure zu unterscheiden. Letztere sollte eigentlich durch ihr optisch aktives Verhalten[59] auffalllen, aber erstens hält es oft schwer eine Aminosäurefraktion in einheitlichem Zustande zu erhalten und zweitens treten leicht Razemisierungsvorgänge auf. Ueber das Vorkommen der beiden Aminobuttersäuren in Proteinen finden sich in der Literatur folgende zerstreute Angaben:

Zuerst behauptete Schützenberger[60] solche als Eiweisspaltprodukt gefunden zu haben. Im Fibroin und Leim wollte sie Fischer[61] festgestellt haben, doch fehlte in beiden Fällen eine sichere Identifizierung. Später von Neuberg und Blumenthal[62], bzw. von Orgler[63], durchgeführte Oxydationen der Gelatine, bzw. des Eieralbumins, mit H_2O_2 lieferten neben andern Stoffen Aceton, dessen Entstehung durch weiterschreitende Oxydation von Leucin oder von Amib gedeutet wurde. Die Bildung von Amib aus Aceton und HCN in Pflanzen hielt übrigens Franzen[64] für möglich. Mörner[65] fand ferner bei der Behandlung von Proteinen mit HNO_3 Oxy-isobuttersäure, deren Auftreten er ebenfalls der Amib zuschrieb. Auch Foremann[66] will aus der Prolinfraktion eines Kaseinhydrolysates Amib bestimmt haben. Die mitgeteilten Angaben genügen jedoch nicht zu ihrer Charakterisierung. Yabuta und Mitarbeiter[69] erhielten bei der trockenen Destillation verschiedener Proteine 5-5-Dimethylhydantoin, dessen Auftreten sie als Be-

*Im Folgenden kurz als Amib bezeichnet.

weis für das Vorkommen von Amib in Proteinen ansahen. Bei pyrogenen Zersetzungen können jedoch verschiedenartige Sekundärprodukte gebildet werden, welche nicht ohne weiteres bestimmten Ausgangsprodukten zugeordnet werden dürfen. Auch Meisenheimer[68] fand "wahrscheinlich" bei der Autolyse von Hefe eine Aminobuttersäure. Abderhalden[69] glaubt aber, dass die aus einer ganzen Anzahl von Proteinen isolierte Aminobuttersäure die n- und nicht die iso-Form ist. Hierfür spricht auch die von Oikawa[70] aus Skleren von Walfischaugen isolierte d-2-Amino-n-buttersäure. Von den beiden Isomeren kommt also nur die normale Form mit Sicherheit als Eiweissbaustein vor, während für das Auftreten von Amib ein eindeutiger Beweis fehlt.[9]

Im Gegensatz zu den bisher in Proteinen gefundenen Aminosäuren trägt die Amib am 2-C-Atom kein H-Atom mehr. Darauf dürfte ihre besondere chemische Beständigkeit zurückzuführen sein. So wird sie z.B. von O_2 an Aktivkohle kaum merkbar oxydiert,[71] weil der zur Dehydrierung in Iminosäure nötige H fehlt. Auffallend ist ferner ihre geringe Neigung zu Sekundärreaktionen bei chemischen Umsetzungen. So entstehen beim Erhitzen von Essigsäureanhydrid mit Benzoyl-Amib keine, mit Benzoyl-Alanin dagegen gelbrote und mit Benzoyl-Hippursäure rotbraune Zersetzungsprodukte.[72] Ein analoges Verhalten zeigen die drei Verbindungen auch bei der Herstellung von ihren Säurechloriden.[73] Die beiden Methylgruppen in 2-Stellung verunmöglichen ausserdem eine Keto-Enol-Tautomerie zwischen dem 2-C-Atom und der CO-Gruppe. Vielleicht könnten solche Aminosäurereste, eingebaut in Peptidketten, die zusätzlichen Bindungen[74] von einer Peptidkette zur nächsten ungleichmässig gestalten, womit das Gitter eines daraus hergestellten Eiweisstoffes gestört wäre.

Es war in diesem Zusammenhang interessant beiläufig zu untersuchen, ob die Amib eigentlich wachstumsfördernd oder -hemmend auf Organismen einwirkt. Dazu wurden folgende Beobachtungen und Prüfungen herangezogen:

a.) Eine zufällige Bildung von 2 kleinen Schimmelpilzkolonien wurde nur einmal in 300 ccm wässrigen Amib-Rückständen bemerkt (p_H 7). Nach monatelangem Stehen wurden weder Vergrösserung der vorhandenen noch neue Kolonien festgestellt. Ueberimpfen einer Oese dieser Schimmelpilze, im Anfang des Pilzwachstums, in eine sterile 10%ige neutrale Lösung von Amib zeigte kein neues Wachstum.

b.) Das gleiche Resultat zeigte ein Versuch mit einer Kolibakterienaufschwemmung. 5 ccm einer 2% wässrigen Lösung von Amib wurden mit 2 Oesen davon versetzt. Die Keimzählungen ergaben bei 37°C nach 0^h in 1/10 000 ccm 700, nach 24^h in 1/10 000 ccm 700 Keime. Das gleiche Keimzahlenverhältnis zeigt, dass keine Vermehrung der Kolibakterien eingetreten ist. Aus den Versuchen a und b geht somit hervor, dass die Amib nicht als alleinige Nährstoffquelle für Schimmelpilze oder Kolibakterien dienen kann. In den Rückständen bei a sind es wahrscheinlich andere Stoffe gewesen, welche das Wachstum der grünen Kolonien förderten.

c.) Dass aber auf der andern Seite die Amib nicht etwa wachstumshemmend einwirkt, bewies folgender Versuch: Je 1 ccm einer 2% sterilen* wässrigen Lösung von Amib, bzw. Alanin wurden mit einer Oese Kolibakterienaufschwemmung versetzt und die Mischung entweder auf Nähragar oder in Nährbouillon übertragen und bei 22°C, bzw. 37°C belassen. In allen Fällen wuchsen Kolonien von Kolibakterien innert 2 Stunden heran. Nach 48^h waren sie noch grösser geworden.**

d.) Um zu entscheiden, ob die Amib als alleinige N-Quelle geeignet ist, wurde abschliessend noch eine Versuchsreihe mit N-freien Nährlösungen*** mit

*Kontrolle durch Eingiessen auf Nährbouillon. P_H = 7.
**Bei den Versuchen b und c war mir Herr Dr. Mündel vom Bakteriologischen Institut der Universität Bern behilflich, wofür ich ihm an dieser Stelle herzlich danke.
***Nach Uschinsky und Fränkel: Im Liter Leitungswasser 0,5gNaCl, 2,0g K-biphosphat, 0,5g Mg-sulfat.

Amibzusatz durchgeführt. Zu 25 ccm einer solchen Nährlösung wurde 0,1g Aminosäure gegeben, das ganze mit KOH auf p_H 7 gebracht, sterilisiert und hierauf mit 2 Oesen Penicillum glaucum beimpft. Bei Amib konnte auch nach 60 Tagen (18°C) kein Wachstum festgestellt werden, während dagegen Vergleichslösungen mit Alanin oder Asparagin bald einen starken Pilzrasen aufwiesen (schon nach 18 Tagen). Die Amib ist daher wenigstens für diesen Schimmelpilz ungeeignet als Stickstoffquelle.

Darstellung der Amib.

Das nach dem Verfahren von Zelinsky und Stadnikow[76] gewonnene Chlorhydrat der Amib* wurde in Methanol gelöst und daraus die freie Aminosäure durch Umsetzung mit Anilin gewonnen.[77] Die Elementaranalyse ergab für $C_4H_9O_2N$:**

Ber.:	C	46,57	H	8,73	N 13,58%
Gef.:		46,70		8,73	13,59%

Die Fällung der Amib aus Amib-HCl mit Anilin war jedoch nicht quantitativ, was folgender Versuch zeigte: 0,21955g Amib wurden mit HCl in das Amib-HCl übergeführt, dieses in 0,9 ccm Metanol gelöst und mit 0,3g Anilin versetzt. Die entstandene rein weisse Fällung wog nach dem Trocknen 0,16000g. Verlust demnach 27%.

Eigenschaften der Amib.

Von den vielen bekannten Eigenschaften der Amib sind nachstehend nur solche besonders erwähnt, welche für diese Arbeit von Wert waren. So liegen über die monoklin prismatischen Kristalle eingehende mineralogische Messungen von

*Strecker'sche Synthese: $(CH_3)_2{:}CO + HCN + NH_4Cl = (CH_3)_2C(NH_2)CN + HCl =$ Amib-HCl.
**C + H Halbmikrobest. n. Hölscher, N Mikrokjeldahl. Ebenso folg. Analysen.

Haushofer vor.[78] Als Ergänzung hierzu zeigt Figur 1 (S. Seite 61) das linienreiche Debye-Scherrer-Diagramm der Amib*. Es wurde aufgenommen, weil sich solche Röntgendiagramme vorzüglich bei den später mitgeteilten Polykondensationsversuchen eigneten, um die während der Reaktion verschwindende oder entstehende Amib auch in Gemengen mit andern Stoffen rasch und einfach erkennen zu können. Zu qualitativen Prüfungen auf die Amib wurden ferner folgende Reaktionen benützt:

a.) Biuretreaktion. Sie ist selbstverständlich negativ, d.h. die Lösung wird sofort tiefblau. Hierzu sei bemerkt, dass sie jeweils nach den Vorschriften der neueren Literatur[79] angesetzt wurde (Ablesungen nach 0-24h).

b.) Cu-Salz. Herstellung: 30mg Amib + 10mg $CuCO_3$ + 3 Tropfen 2% Sodalösung + 1 Minute kochen = tiefblaue Lösung. Höhere Peptide oder das Diketopiperazin geben erst nach 1-2 Tagen, infolge hydrolytischer Aufspaltung, eine Blaufärbung. Mit niederen, wasserlöslichen Peptiden entstehen stark rote bis violette Lösungen.

c.) Alloxanreaktion.[80] Die Amib gibt in wässriger Lösung mit Alloxan erst beim Kochen eine stark karminrote Färbung. Ansätze: 30mg Amib + 50mg Alloxan + 3 Tropfen H_2O. Gleichfalls positiv wird die Reaktion beim 2-Amino-isobutter-N-carbonsäureanhydrid. Sobald jedoch die primäre Aminogruppe z.B. durch die Azetyl- oder Carbomethoxygruppe besetzt ist, bleibt sie erwartungsgemäss aus, auch dann, wenn das p_H bis 3,5 fällt. Zum p_H sei bemerkt, dass Erhitzen von Alloxan allein in mineralsaurer, sodaalkalischer oder ammoniakalischer Lösung sofort Rotfärbung ergibt. Darauf musste stets Rücksicht genommen werden. (p_H von Amib in H_2O = 7). Das Diketopiperazin und die höheren Peptide der Amib geben keine Rotfärbung, deshalb war die Alloxanreaktion ein einfaches Kriterium für die Anwesenheit von Amib (und niederen Peptiden). Ueber die Alloxanreaktion orientieren die Arbeiten von Wocker[81] und Abderhalden.[82]

*Näheres über Röntgenaufnahmen s. Seite 61.

d.) Merkuronitratreaktion. Mit $HgNO_3$ + Amib entsteht in sodaalkalischer Lösung sofort ein schwarzer Niederschlag. Ansätze: 30mg Amib + 1 Tropfen gesättigte $HgNO_3$-Lösung + 1 Tropfen H_2O + 1 Tropfen 2% Sodalösung. Auch das N-carbonsäureanhydrid gibt mit diesem Reagens einen Niederschlag, entwickelt aber dazu noch CO_2. Dagegen reagieren nicht das N-acetyl- und das N-carbomethoxylderivat der Amib, ferner das Diketopiperazin und höhere Peptide. Die Anwendung dieser Reaktion verlangt ebenfalls Vorsicht, weil schon kleine NH_3-Mengen eine schwarze Fällung geben.

e.) Eine einfache Kontrollreaktion besteht in der Prüfung auf den süssen Geschmack der Amib. Alle übrigen untersuchten Verbindungen waren nur dann süss, wenn sie Amib enthielten.

f.) Zur Sublimation sei bemerkt, dass bei Amib grobe, weisse, makroskopische Nadeln entstehen, die sich ohne weiteres von den feinen, langen des Diketopiperazins unterscheiden lassen. Mit Hilfe der Sublimation gelang es öfters aus Gemischen die Amib herauszuholen.

g.) Zum Nachweis der Amib wurde ferner ihr Hydantoin benützt. Dessen Herstellung gelang am besten nach der Methode von Heilpern[83] durch Schmelzen von 1 Mol Amib mit 1 Mol Harnstoff bei 170°C. Nach dem Umkristallisieren aus Alkohol konnte der Schmelzpunkt von 175°C bestätigt werden.

h.) In wichtigen Fällen wurde eine Elementaranalyse ausgeführt.

2. 2-Amino-isobuttersäure-äthylester $(CH_3)_2:C(NH_2).COOC_2H_5$

Darstellung.

Ein Verfahren zur Herstellung von Amib-äthylester wurde schon von Zelinsky und Kulikow[84] beschrieben. Hier wurde die bekannte Fischer'sche Methode[85] gewählt: Amib + abs. Alkohol + HCl-Gas ⟶ Esterchlorhydrat + NaOH ⟶ Ester. Die Ausbeute an reinem Ester, berechnet auf die angewandte Amib, betrug dabei 26%. Die Elementaranalyse ergab für $C_6H_{13}O_2N$:

Ber.:	C	45,77	H	0,99	N 10,69%
Gef.:		45,86		0,90	10,67%

Eigenschaften.

a.) Kp nach Zelinsky[84] 38,5 - 41 °C/11 mm, gefunden 44 - 45,5 °C/12 mm, bzw. 146°C/718 mm Hg (als Mikro-Kp bestimmt). Beim Erhitzen auf 150°C wird der Ester allmählich braun. Erhitzen in geschlossenen Röhren auf 200 - 300° liefert das Diketopiperazin der Amib, jedoch keine biuretpositiven Anteile.

b.) Löslichkeit. Der Ester ist in beliebigen Verhältnissen mit H_2O, Alkohol, Aceton, Benzol, Chloroform, Essigester und Anilin mischbar. In Eisessig, HCl, H_2SO_4 und in Dimethylsulfat löst er sich unter Erwärmung.

c.) Er ist farblos und riecht schwach ammoniakähnlich. In H_2O hat er ein p_H von 8,5. Sein Geschmack ist brennend. Mit Alloxan entsteht keine Rotfärbung. Die Biuretreaktion ist negativ. Mit Sodalösung + $CuCO_3$ entsteht beim Erhitzen sofort eine tiefblaue Lösung. Wird der Ester in der Gaskammer mit konzentrierter NaOH versetzt und oben ein Objektträger mit Nesslers-Reagens aufgesetzt, so bildet sich nach etwa 5 Minuten ein gelber Niederschlag.

d.) Der Ester zersetzt sich beim Stehen nur langsam. So bildete sich aus 11g innert 2 Jahren nur 0,13g eines festen, weissen Bodenkörpers. Letzterer erwies sich auf Grund seiner Eigenschaften, seines Debye-Scherrer-Diagrammes und seiner Elementaranalyse als Amib. Beim Stehen wird demnach der Amib-äthylester nicht in Diketopiperazin[86] übergeführt, sondern einfach verseift (Offenbar durch Spuren H_2O). Frisch hergestellter Alaninäthylester enthielt im Gegensatz dazu schon nach 2 Monaten wenig flüssige und viel feste Substanz.

3. 2-(Carbomethoxyamino)-isobuttersäure $(CH_3)_2:C(NH.COOCH_3)COOH$

Darstellung.

Bisher ist diese Substanz nicht hergestellt worden, wohl aber N-carbomethoxy-verbindungen anderer Aminosäuren.[36] Zu ihrer Gewinnung wurden 30,9g Amib (0,3 Mol) in 300 ccm n-NaOH (0,3 Mol) gelöst und allmählich mit 34,0g $ClCOOCH_3$ (0,36 Mol) unter Schütteln und Kühlen versetzt. Durch portionenweises Zugeben von 79,5 ccm 20% Sodalösung (1,5 Mol) wurde das p_H schwach alkalisch gehalten. Dauer 5^h. Jetzt wurde die Lösung im Flüssigkeitsextraktor mit 200 ccm 10% HCl versetzt und das entstandene Carbomethoxyderivat der Amib 3^h mit Aether extrahiert. Reaktionsfolge: $(CH_3)_2:C(NH_2)COOH + ClCOOCH_3 = (CH_3)_2:C(NHCOOCH_3)COOH + HCl$. Nach Verjagen des Aethers blieben 37,92g (= 78,5% Rohausbeute) weisse Kristalle zurück. Deren Schmelzpunkt stieg nach dem Umkristallisieren aus H_2O und Butanol nur unwesentlich um 1^o auf 158^oC (korr.), ein Zeichen, dass die Verbindung fast rein anfällt. Im Gegensatz dazu mussten Carbomethoxyderivate anderer Aminosäuren erst durch eine Behandlung mit Tierkohle von dunklen Verunreinigungen befreit werden. Aus der ausgeätherten, wässrigen Lösung konnten von 7,24g nicht umgesetzter Amib 6,8g

zurückgewonnen werden. Die Elementarzusammensetzung ergab für $C_6H_{11}O_4N$:

Ber.:	C	44,70	H	6,83	N	8,70%
Gef.:		44,86		6,91		8,70

Eigenschaften.

a.) Kristallform. Aus wässriger Lösung gelingt es ohne Schwierigkeiten beim langsamen Eindunsten grosse, durchsichtige und farblose Einkristalle zu züchten. Diese sind rhombisch, wie aus kristalloptischen Untersuchungen (gerade Auslöschung, Achsenbild zweiachsig) und aus einer goniometrischen Vermessung der Flächenwinkel hervorgeht. Die Grund- und Deckebenen stehen darnach senkrecht auf den Seitenflächen und die Seitenflächen selbst weisen folgende Winkel auf (s, Fig. 2):

1.	65°	43'
2.	65	50
3.	24	10
4.	23	55
5.	66	03
6.	65	56
7.	24	15
8.	24	08

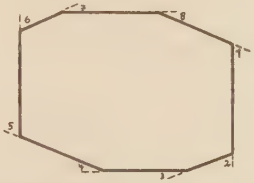


Fig. 2
Carbomethoxy-Amib-Kristall im Grundriss.

Man sieht, dass die Winkel 1, 2, 5, 6 und 3, 4, 7, 8 je unter sich gleich gross sind (innerhalb der Fehlergrenzen). Das linienreiche Röntgendiagramm der Verbindung gibt Figur 3 (Seite 61) wieder.

b.) Schmelzpunkt. Nach dem Umkristallisieren aus H_2O und darnach aus Butanol schmilzt die Substanz scharf bei 158,0°C (korr.). Beim höheren Erhitzen zersetzt sich alles unter CO_2-Abspaltung und Bildung von 3-6-Dioxo-2-2-5-5-tetramethylpiperazin u.a. Produkten (s.a. unter Diketopiperazin).

c.) Löslichkeit. Lösungsmittel, die bei keiner Temperatur lösen, sind: Tetrachlorkohlenstoff, Ligroin. Lösungsmittel, die kalt wenig und heiss gut lösen: H_2O (2,7g in 100 ccm bei 17°C), Butanol, Amylalkohol, Benzol, Toluol, Xylol, Eisessig, NaOH, Dimethylsulfat, konz. HCl. Lösungsmittel, die schon

kalt gut lösen: Alkohol, Propanol, Aceton, Essigester, (Aether), Anilin, Chloroform, konzentrierte Schwefelsäure.

d.) Die Verbindung hat einen säuerlich-süssen Geschmack. Sie reagiert in wässriger Lösung sauer (p_H 2,31 in 0,1 mol. Lsg bei 13°C). Ueber Alloxan- und $HgNO_3$-Reaktion vgl. Seite 13-14. Mit $CuCO_3$ + Na_2CO_3 entsteht keine Blaufärbung. $KMnO_4$-Lösung wird erst in der Hitze reduziert.

4. 2-Amino-isobutter-N-carbonsäureanhydrid $(CH_3)_2:\overline{C-CO-O-CO-NH}$

Darstellung.

Nach Leuchs[36] werden dazu N-carbomethoxy-, bzw. N-carbäthoxyderivate von Aminosäuren mit Thionylchlorid behandelt. Die entstehenden Säurechloride spalten hierauf leicht Methyl-, bzw. Aethylchlorid ab, wobei sich unter Ringschluss N-carbonsäureanhydride bilden: $(R_1R_2):C(NH.COOR_3)COOH + SOCl_2 = (R_1R_2):C(NH.COOR_3)COCl = (R_1R_2):\overline{C-CO-O-CO-NH} + R_3Cl$. Einen andern, weniger allgemein gangbaren Weg fand Curtius[39] zufälligerweise als er Aethylmalonazidsäure in H_2O erhitzte: $(RH):C(CON_3)COOH = \left[(RH):C(N{=}CO)COOH\right] = (RH):\overline{C-CO-O-CO-NH}$ ($R = C_2H_5$).

Das N-carbonsäureanhydrid der Amib ist bisher nicht dargestellt worden. Es konnte aber ohne weiteres nach dem Verfahren von Leuchs[36] gewonnen werden. Dazu wurden 6,0g 2-(Carbomethoxyamino)-isobuttersäure mit 10,8 ccm $SOCl_2$ $1\frac{1}{2}^h$ im Wasserbad auf 40-60°C erwärmt, wobei die Säure unter Gasentwicklung in Lösung ging. Nach dem Abdestillieren des überschüssigen $SOCl_2$ im Vakuum bei 60° wurde der Kolbeninhalt 1^h im Vakuum auf 70°C erwärmt. Hierbei ent-

stand unter Abspaltung von Methylchlorid allmählich 4,6g festes, gelbliches N-carbonsäureanhydrid. Dieses Rohprodukt wurde nun in kaltem, wasserfreiem Aceton gelöst und mit Tierkohle behandelt. Nach dem Filtrieren und Eindunsten im Vakuum bildeten sich 4,1g (=85% Ausbeute) fast reine weisse Kristalle, welche nach Umkristallisieren aus wasserfreiem Benzol (Waschen mit Bzl. und Ligroin) analysenrein waren. Die Elementarzusammensetzung ergab für

$C_5H_7O_3N$:	Ber.:	C	46,49	H	5,42	N	10,85%
	Gef.:		46,42		5,71		10,89%

Wieder zeigte es sich, dass auch dieses Derivat der Amib ohne wesentliche Nebenprodukte kristallin entsteht. Im Gegensatz dazu fällt z.B. das Anhydrid der N-carbomethoxy-C-phenylaminoessigsäure als ölig brauner Sirup an.[38] Vom Rohprodukt war in den Lösungsmitteln nicht immer alles löslich, besonders wenn das Erhitzen beim Umkristallisieren aus Benzol zu lange dauerte, oder wenn die Lösungsmittel H_2O enthielten (s. unten).

Eigenschaften.

a.) Kristallform. Eine Züchtung von grösseren Einkristallen gelang nicht. Aus Alkohol-, Aceton-, Benzol- oder Essigesterlösungen entstanden nur 0,02 - 0,1 mm grosse Kriställchen. Hängte man solche in eine gesättigte Lösung, in der Absicht sie weiter wachsen zu lassen, so wurden die Flächen unter CO_2-Abspaltung und Polykondensation allmählich matt, was das weitere Wachstum hemmte. Die Verbindung kristallisiert entweder monoklin oder triklin, was aus der schiefen Auslöschung und den Kristallformen (Fig. 4) zu schliessen ist. Das linienreiche Debye-Scherrer-Diagramm gibt Figur 5 wieder.*

b.) Schmelzpunkt. Die frisch umkristallisierte Substanz schmilzt scharf bei 95,2°C (korr.). Hält man die Schmelze längere Zeit auf 95-100°, so erfolgt Abgabe von CO_2 unter Verfestigung des Ganzen. Sie zeigt jetzt Biuretreaktion und sublimiert zum grössten Teil zwischen 215-285°. Ein geringer

*Seite 61.

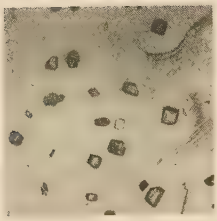


Fig. 4. N-carbons.-anhydrid der Amib. Unzersetzt. Vergr. 59x

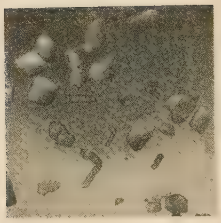


Fig. 6. Durch Luftfeuchtigkeit zersetztes N-carbons.-anhydrid der Amib Vergr. 65x

Teil verkohlt bei Rotglut. Beim mehrfachen kurzen Erhitzen auf die Schmelztemperatur tritt keine merkliche Zersetzung ein.

c.) Löslichkeit. Lösungsmittel, die bei keiner Temperatur lösen: Ligroin. Lösungsmittel, die kalt wenig und heiss gut lösen: H_2O (Zers.), konz. HCl, konz. H_2SO_4, $(CH_3)_2SO_4$, Aether, Essigester, Benzol (2g in 100 ccm bei 20°; 38g in 100 ccm bei 75°C). Lösungsmittel, welche schon kalt gut lösen: Alkohol, Aceton (80g in 100 ccm bei 20°), Chloroform, Anilin (unter CO_2-Zers.).

d.) Zersetzlichkeit. Wird das Anhydrid in einem wasserfreien Lösungsmittel über 80° erhitzt, so zersetzt es sich teilweise unter Abscheidung weisser, biuretpositiver Flocken. Aus dem Filtrat davon kristallisiert wieder unverändertes N-carbonsäureanhydrid. Nach monatelangem Aufbewahren an der Luft hatte sich die Substanz ebenfalls zersetzt: So lösten sich von ursprünglich 5,5g Anhydrid nach 7 Monaten 1,6g gar nicht, 0,8g nur in viel und der Rest leicht in heissem Benzol. Letzterer gab nach dem Umkristallisieren wieder den Schmelzpunkt von 95°. Die schwerlöslichen Anteile schmolzen zwischen 110-120° teilweise und die unlöslichen Anteile gar nicht. Wird aber das Anhydrid in einer evakuierten Ampulle aufbewahrt und somit vor Luftfeuchtigkeit geschützt, so verändert sich der Schmelzpunkt nicht (Kontrolle nach 4 Monaten). Mit Hilfe des Schmelzpunktes kann somit eine Aussage über

den Zersetzungsgrad gemacht werden. Dies ist auch möglich durch Kontrolle der Löslichkeit z.B. in Aceton: Frisch hergestelltes und an der Luft aufbewahrtes Anhydrid löst sich vollständig darin, 6 Wochen altes bis auf eine geringe Trübung, 6 Monate altes zum grösseren Teil und 10 Monate altes nur noch spurenweise. Das Produkt in der Ampulle gab nach 4 Monaten eine geringe Trübung. In diesem Zusammenhange sei noch die ständig abnehmende Zahl doppelbrechender Kristalle in bei Luftfeuchtigkeit aufbewahrtem Anhydrid erwähnt. Sie gibt ebenfalls einen qualitativ leicht feststellbaren Aufschluss über den Zersetzungsgrad, ohne dass Rückgewinnungsmethoden angewandt werden müssen. Die Kristalle werden allmählich matt (s. Fig. 6), wobei der Zerfall gleichmässig vorwärts zu schreiten scheint.

d.) Weitere Reaktionen. Die Verbindung hat einen säuerlich-bitteren Geschmack. Sie reagiert, infolge der CO_2-Abspaltung, in wässriger Lösung sauer (p_H = 4,3). Wird die wässrige Lösung $\frac{1}{2}^h$ evakuiert oder kurz aufgekocht, so verschiebt sich das p_H gegen 7 unter Verflüchtigung des CO_2. Aus dem N-carbonsäureanhydrid ist dabei Aminosäure entstanden (s. Polykondensationsversuche). Sie gibt mit Alloxan erhitzt eine starke Rotfärbung, mit $HgNO_3$ versetzt sofort eine schwarze Fällung. Zudem entwickelt sich in beiden Fällen CO_2. Die wässrige Lösung entfärbt ferner Br-Wasser rasch, $KMnO_4$-Lösung allmählich in der Hitze. Mit dem Karbonsäureanhydridreagens nach Feigl[87] entsteht eine tiefrote Färbung. Ebenso reagieren ältere Präparate. Polykondensate geben die Färbung höchstens in Spuren, während die Amib, ihre N-carbomethoxyverbindung und das Diketopiperazin nicht reagieren. Kochen mit Sodalösung und $CuCO_3$ führt sofort zu einer tiefblauen Lösung. Sowohl beim Aufbewahren an der Luft wie auch beim Stehen der wässrigen Lösung wird die Biuretreaktion allmählich positiv. (Näheres über die Reaktionsmechanismen s. S. 40ff).

5. 3-6-Dioxo-2-2-5-5-tetramethylpiperazin $\overline{CO\text{-}NH\text{-}C(CH_3)_2\text{-}CO\text{-}NH\text{-}C(CH_3)_2}$

Dieses Diketopiperazin wurde schon von verschiedenen Forschern beschrieben.[88,58,21] Hier wird berichtet, unter welchen Bedingungen es aus Amib und ihren Derivaten durch Kondensation etc. entsteht. Zudem werden neue Beobachtungen über seine Eigenschaften mitgeteilt.

Darstellung.

Bei einer Anzahl von Reaktionen tritt es als Nebenprodukt auf. Es entsteht aber sowohl aus der Amib, als auch aus deren Derivaten nur schwer, wie dies allgemein von Diketopiperazinen mit quaternären C-Atomen bekannt ist.[89,88] Wird die Aminosäure allein nur bis 180° erhitzt,[90,89] so bildet sich kaum, beim Zusatz von Phthylsäureanhydrid*[91] etwas mehr Diketopiperazin. Eigene Versuche zeigten dann (s.S. 33), dass diese Kondensation erst bei höherer Temperatur und unter Druck befriedigende Ausbeuten liefert. So entstanden je nach Erhitzungsdauer (3-20h) in geschlossenen Röhren bei 300-350°C neben gasförmigen und flüssigen Produkten bis zu 54% rohes Diketopiperazin, welches in kurzen und langen Nadeln (2-25 cm!) z.T. das Rohr schräg durchzog. Nach Behandlung mit Aether, wenig Alkohol und H_2O wurde die jetzt fast farblose Nadelmasse im Vakuum sublimiert. Reine Substanz konnte so bis zu 41%, berechnet auf angewandte Amib, gewonnen werden. Die Elementaranalyse ergab für

$C_8H_{14}O_2N_2$:	Ber.:	C	56, 43	H	8, 29	N	16,47%
	Gef.:		56, 58		8, 23		16,44%

Andere Darstellungsweisen gehen vom Amib-ester aus. Trotz tagelangem Erhitzen des Methylesters im Einschlussrohr auf 240° erhielt aber Franchimont[11] nur Ausbeuten bis 34%. Noch schwerer dürfte der Aethylester in das Di-

*Abderhalden setzte auch Chinolin und Tierkohle zu. Ausbeutezahlen fehlen.[92]

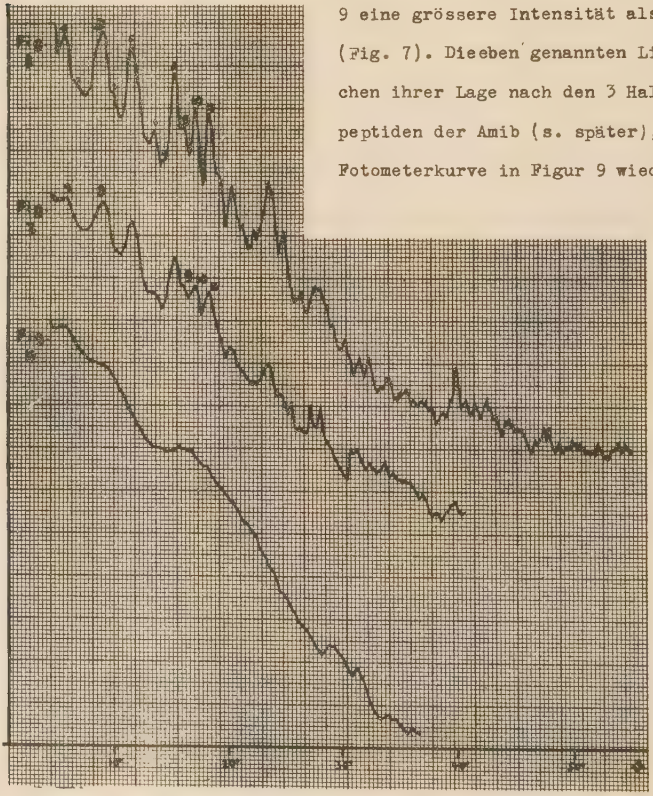
ketopiperazin übergehen.[86,93] Eigene Versuche damit ergaben, dass er beim Erhitzen im Einschlussrohr mit höher werdenden Temperaturen zunehmende Mengen von Diketopiperazin liefert. Auch Dipeptide sind Ausgangssubstanzen zur Gewinnung von Diketopiperazinen.[94] Schon bei ihrer Darstellung entstehen letztere oft als Nebenprodukte[9], besonders leicht aber beim Erhitzen der Dipeptide. So wurden z.B. aus dem Dipeptid der Amib bei 240° in der 20-fachen Menge Diphenylamin Ausbeuten bis zu 90% erhalten.[95,92] Weitere Darstellungsweisen beschrieben einerseits Thiele und Heusser[96], andererseits Dubsky und Wensink.[97] Erstere erhitzten Hydrazi-amib im geschlossenen Rohr auf 270° und letztere verseiften Imino-di-isobutyronitril mit Schwefelsäure.

Von weiteren Derivaten ausgehend konnte das Diketopiperazin der Amib auch in eigenen Versuchen gewonnen werden:

a.) Bemerkenswert gross waren die Ausbeuten beim Erhitzen von 2-(Carbomethoxyamino)-isobuttersäure über deren Schmelzpunkt. In geschlossenen Bombenröhren wurden dazu 2,00g dieser Substanz auf 180° erhitzt. Beim Oeffnen nach 6^h strömte ein aminartig riechendes Gas aus, das unter starkem Druck gestanden haben musste. Es enthielt zur Hauptsache CO_2, jedoch kein freies NH_3, entwickelte aber mit HCl konz. starke, weisse Nebel. Der Rohrinhalt bestand aus einer verfilzten, farblosen Nadelmasse, deren Zwischenräume von einer gelblichen Flüssigkeit angefüllt waren. Letztere löste sich grösstenteils in Aether. Die klebrigen Nadeln wurden hierauf noch mit wenig Alkohol gewaschen (2,5ccm); sie waren jetzt rein weiss, geruch- und geschmacklos und nicht mehr klebrig (0,65g = 61% Ausbeute). Ihre chemischen Reaktionen, ihr Löslichkeits- und Sublimationsverhalten, ihr Kristallhabitus und -Bau (Debye-Scherrer-Diagramm) und endlich ihr N-Gehalt (gef.: N 16,49%) entsprachen dem Diketopiperazin der Amib.

b.) Endlich gab auch das N-carbonsäureanhydrid der Amib beim Erhitzen auf oder über dessen Schmelzpunkt unter CO_2-Abgabe (vgl. S. 19) ein Stoff-

gemisch, das geringe Mengen Diketopiperazin enthielt (s. Polykondensationsversuche). Das Stoffgemisch wurde in warmer, konzentrierter H_2SO_4 aufgelöst. Durch Verdünnen mit H_2O, unter gleichzeitigem Neutralisieren mit NH_3, fiel ein kleiner Teil wieder aus (3,8%). Dieser gab ein Debye-Scherrer-Diagramm, welches neben den amorphen Ringen von Polypeptiden die scharfen Linien des Diketopiperazins aufwies. Vergleicht man nämlich die Fotometerkurve dieses Diagramms (Fig. 7) mit derjenigen des reinen Diketopiperazins (Fig. 8), so ist die Uebereinstimmung deutlich ersichtlich. Wegen des Polypeptidgehaltes sind die Linien 1 nach links und 3 nach rechts verbreitert und hat die Linie 9 eine grössere Intensität als 10 und 11 (Fig. 7). Dieeben genannten Linien entsprechen ihrer Lage nach den 3 Halos von Polypeptiden der Amib (s. später), von denen eine Fotometerkurve in Figur 9 wiedergegeben ist.



Eigenschaften.

a.) Kristallform. Es entstehen meist schief abgeschnittene Nadeln, deren Länge bis 25 cm betragen kann! Sie splittern leicht in der Längsrichtung. Kurze, derbe Prismen traten weniger auf und sechsseitige Platten, wie sie Gabriel[88] feststellte, wurden keine beobachtet. Polarisiertes Licht wird schief und gerade (letzteres vereinzelt beobachtet) ausgelöscht. Die Verbindung kristallisiert daher monoklin (ev. triklin). Ihr linienreiches Debye-Scherrer Diagramm gibt Figur 10 (s. Seite 61) wieder.

b.) Nachstehend sollen einige Andeutungen über die Anordnung der Moleküle in den Kristallnadeln gemacht werden. Eine solche Untersuchung war deshalb wichtig, weil es sich stets zeigte, dass das Diketopiperazin das beständigste Kondensat der Amib oder deren Derivaten ist. Die kleinste Identitätsperiode ist in der Regel in der Richtung der Faserachse zu erwarten. Daher wurde zuerst eine Röntgendrehaufnahme um die Nadelachse aufgezeichnet (Fig. 11), deren Auswertung eine Identitätsperiode von 5,93 Å für die Längsachse ergab. Diese Angabe allein genügt aber nicht, um aussagen zu können, in welcher Richtung die Moleküle aneinandergelagert sind. Auch eine Bestimmung des Parallelepipeds würde erst weiter führen, wenn man dazu noch die den verschiedenen Atomen zukommenden Intensitätsunterschiede heranziehen würde.[vgl.98] Trotzdem können aus der gefundenen Identitätsperiode und aus den Moleküldimensionen, welche vom Modell ableitbar sind (Fig. 12), gewisse Schlüsse auf die Aggregation der Moleküle im Kristall gezogen werden. Dafür zeigt Figur 13 drei verschiedene Anordnungen der Moleküle in Bezug auf das Längenwachstum der Nadeln. Dabei ist Form I auszuschliessen, weil die Faserperiode grösser als 5,9 Å würde. Zählt man nämlich die eingetragenen Abstände zusammen, so erhält man, ohne den Abstand zwischen den Molekülen zu rechnen, schon 6,10 Å. Zudem würden sich bei dieser Lage der Moleküle wegen der polaren CO- und NH-Gruppen Kräfte senkrecht zur Längsrichtung ergeben, was mit der Nadel-

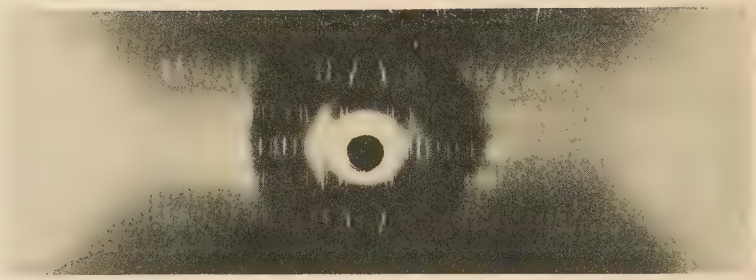


Fig. 11. Drehkristallaufnahme vom Diketopiperazin der Amib (Drehachse = Nadelachse). Daten: Cu K_α-Strahlung (1,539 Å), Kameraumfang 182 mm.

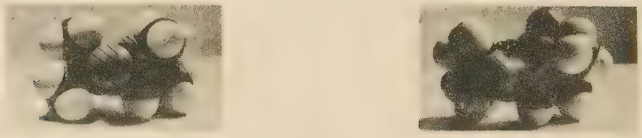


Fig. 12. Modelle vom Diketopiperazin der Amib (Weiss = H, schwarz = C, // = N, \\ = O)

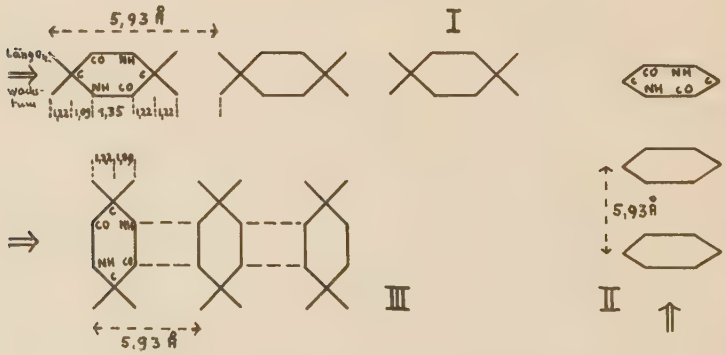


Fig. 13. Mögliches Längenwachstum des Diketopiperazins.

form der Kristalle schlecht zu vereinbaren wäre.

Form II bestünde in der Uebereinanderlagerung der fast eben gebauten 6-Ringe. Die Molekülдicke der Ringe beträgt etwa 2,5 Å. Für den Molekülabstand blieben somit 3,4 Å übrig, was möglich wäre. Doch müssten bei dieser Anordnung auch Anziehungen der heteropolaren Gruppen senkrecht zur Nadelachse wirksam werden und dadurch das Längenwachstum weniger ausgesprochen gestalten. Damit wird diese Form ebenfalls unwahrscheinlich.

Am ehesten vereinbar mit der gefundenen Identitätsperiode ist Wachstumsform III. Hier bleibt ein Molekülabstand von 3,6 Å übrig. Jetzt müssten auch zusätzlich anziehende Kräfte der heteropolaren Gruppen (in Fig. 13 gestrichelt) ein Längenwachstum begünstigen. Betrachtet man noch die unteren Molekülhälften in III, so erhält man von links nach rechts gesehen das Bild einer gedehnten Peptidkette, das ähnlich ist demjenigen von Peptidketten in Faserproteinen mit einer Aminosäurelänge von 3,5 Å.[3]

c.) Löslichkeit. Sie ist gering in H_2O, Alkohol (Beim Kp: 1:400, eig. Vers.), Essigester, Aceton, Eisessig (z.T. bekannt aus Lit.[88]), mässig in H_2SO_4, heissem $(CH_3)_2SO_4$, gross in HCl konz. Aus H_2SO_4- oder HCl- Lösungen wird das Diketopiperazin durch Verdünnen mit H_2O, aus der $(CH_3)_2SO_4$-Lösung beim Abkühlen wieder gefällt. In Formamid, Dioxan und Xylol ist es unlöslich.

d.) Reaktionen. Nach 18-stündigem Erhitzen im Rohr auf 360°C war es noch unverändert (F 260°[88] vgl.92). Die Alloxan- und Biuretreaktionen sind negativ. Es reduziert weder $HgNO_3$- noch $KMnO_4$-Lösungen[91,92]. Die alkalische Spaltung in Amib schreitet nur langsam vorwärts (nach 3 Tagen in 2n NaOH: -, nach 10 Tagen: (+)) vgl. 21,94,99 Azetylierungsversuche misslangen[88]; die Nitrierung ging schwer[88]. Der Anhydridnachweis mit m-Dinitrobenzol (1-3-5) war im Gegensatz zum Befund Abderhaldens stets negativ (gelb)[100,93], während Pepton als Kontrollsubstanz sofort positiv reagierte (tiefrot). Das Diketopiperazin hat keinen Geschmack.

P O L Y K O N D E N S A T I O N S V E R S U C H E .

1. ERHITZEN VON AMIB UND IHREM ESTER IN OFFENEN UND GESCHLOSSENEN ROEHREN.

Allgemeines.

Auf Seite 4 und 6 wurde bereits dargelegt, dass Glykokoll und sein Ester verhältnismässig leicht zu Peptiden polykondensierbar sind. Doch schon das nächst höhere Homologe bietet einer analogen Verkettungsreaktion erheblichen Widerstand. So konnte Balbiano, als er Alanin unter Zusatz von Glyzerin 30^h im geschlossenen Rohr auf 170^o erhitzte, keine Aenderung beobachten.[11,12] Ebensowenig bildete sich aus seinem Ester ein Biuretkörper.[14] Eine noch geringere Neigung zu solchen Reaktionen ist auf Grund des früher Mitgeteilten vom nächsten Glied, der Amib, zu erwarten. Leichter in der gewünschten Richtung reagieren dann wieder einzelne höhere 2-Aminosäuren[12] oder solche, deren Aminogruppe weiter von der COOH-Gruppe entfernt ist.[101]

Die geeignetste Reaktionstemperatur liegt z.B. für Glykokoll bei etwa 160^oC. Oberhalb 200^o entstehen statt der gewünschten kettenförmigen mehr zyklische Verbindungen, meist Diketopiperazine, neben andern Zersetzungsprodukten.[102] Unter 100^o scheinen keine Peptide zu entstehen[5] (eine Ausnahme bildet der Glykokollester, s. Seite 6). Die Erhitzungsdauer[5,11] bewegt sich dabei in Grenzen von 5-30^h. Beim Glykokoll waren gewöhnlich erst nach etwa 12^h grössere Peptidmengen entstanden.

Allgemein konnte bisher festgestellt werden, dass Erhitzen in offenen Gefässen zu unerwünschten dunklen Verunreinigungen führt.[5,13] Versuchte man diese z.B. an Tierkohle zu adsorbieren, so blieben begreiflicherweise auch Peptide darin zurück und die restliche, immer noch braune Substanz, dürfte gerade an

Polypeptiden ärmer geworden sein. Auch Umfällungen erwiesen sich als wenig erfolgreich. Weder Einleiten von N_2 oder H_2[13] noch Belichtungsschutz[5] während dem Erhitzen hatten einen Einfluss auf die Bildung der dunklen Produkte. Sobald aber mit geschlossenen Röhren gearbeitet wurde, traten sie in bedeutend geringerem Masse auf.[5,90] Evakuieren der Gefässe brachte dagegen keine weitere Verbesserung.[5,90] Die Erscheinung, dass im offenen Gefässe stark gefärbte Produkte, im geschlossenen aber fast keine Verfärbung auftritt, steht in Zusammenhang mit der relativ leicht erfolgenden CO_2-Abspaltung aus Aminosäuren. Diese Abspaltung schreitet im ersteren Falle beständig weiter, wobei der N-reichere Rest verschiedene weitere Reaktionen unter gleichzeitiger Farbvertiefung (Zers.) eingehen kann.[103] In geschlossenen Systemen dürfte der bald entstehende CO_2-Ueber-druck einen ähnlichen Reaktionsverlauf stoppen.

Auch Abspaltung von NH_3 ist zu erwarten. So hat Gawrilow[104] Aminosäuren in neutralen oder schwach sauren Lösungen im Autoklavon erhitzt und dabei folgende NH_3-Mengen gefunden (Abspaltung berechnet auf Gesamt-N):

Glykokoll	0,2-0,7%	Glutaminsäure	0%
Alanin	0,9-1,3	Asparaginsäure	10-65
Aminobuttersäure	0,02	Glykokolldiketo-piperazin	1,5
Leucin	0,7-6,8		

Endlich sei noch auf die Bildungsmöglichkeit von Aldehyden oder Ketonen aufmerksam gemacht.[105]

Oft sind die Aminosäuren auch mit Kondensations- oder höhersiedenden Lösungsmitteln erhitzt worden. Diese sollten das abzuspaltende Wasser entweder aufnehmen oder doch dessen Abspaltung begünstigen. Am meisten wurde hierzu Glyzerin gebraucht.[5,11,13] Andere Stoffe wie Diphenylamin,[92,95] Naphthalin,[91] Anilin,[92] Chinolin,[92] Phthalsäureanhydrid[91] und Cymol[11] sind ebenfalls der Aminosäure, dem Dipeptid oder dem Ester zugesetzt worden, ohne aber besseren Erfolg zu zeitigen.

Nach all den bekannten Tatsachen war es von vornherein fraglich, ob durch geeignetes Erhitzen von Amid und ihrem Ester, mit oder ohne Zusatzstof-

fe, der Reaktionsweg so geleitet werden konnte, dass Peptidverkettungen eintraten. Dennoch sind, um ein vollständiges Bild zu erhalten, solche Versuche unter wechselnden Bedingungen angesetzt worden. Sie führten aber nicht über das Stadium von Vorprüfungen hinaus, weil unter den gewählten Bedingungen tatsächlich keine Polypeptide entstanden.

Versuche in offenen Gefässen.

1.) 1g Amib + 1g Glyzerin. Ein erster Versuch mit Glyzerinzusatz sollte einen Einblick in die Reaktionsfähigkeit der Amib vermitteln, um Vergleiche zum entsprechenden Verhalten des Glykokolls zu ermöglichen. Das obige Gemisch wurde in einem kleinen Erlenmeyerkolben mit 5ccm H_2O versetzt und langsam auf 110°C erhitzt, bis das H_2O nach $5\frac{1}{4}^h$ zur Hauptsache verdampft war. Entsprechend der H_2O-Abnahme fiel die Aminosäure wieder aus. Beim darauffolgenden Erhitzen im Trockenschrank auf 160° wurde alles innert weniger Stunden verfärbt und nach 24^h war eine dunkelbraune, kristalline, klebrige Masse entstanden. Die dunkeln Teile lösten sich schlecht in Aether, besser in Aceton und gut in Alkohol und bestanden zur Hauptsache aus Glyzerin. Durch Behandlung mit Tierkohle liessen sich die alkoholischen Auszüge fast vollständig entfärben. Beim Eindampfen hinterliessen sie nur Spuren eines nadelförmigen, festen Niederschlages von Diketopiperazin. Weder dieser Niederschlag, noch die Lösung oder der mit braunen Flöckchen durchsetzte kristalline Rückstand zeigten eine positive Biuretreaktion. Letzterer erwies sich auf Grund seines chemischen und physikalischen Verhaltens als zur Hauptsache aus unveränderter Amib bestehend. Die Amib hatte sich also bis auf die oben erwähnten Spuren von Diketopiperazin nicht verändert. Unter den gleichen Bedingungen gibt aber Glykokoll bereits Peptide!

2.) 1g Amib + 8g Tetralin. (Letzteres wurde erst über Na, dann über $KMnO_4$ destilliert). Das in einem Erlenmeyer befindliche Gemisch wurde 19^h auf 140-165°C erhitzt. Dabei blieb die fein pulverisierte Amib ungelöst. Schon nach 2-stündiger Erwärmung hatte sich alles dunkelbraun verfärbt. Bis zum Schluss war dann keine weitere Veränderung zu beobachten. Die farbigen Anteile lösten sich vollständig in Aceton, gut in Aether oder Alkohol. Die filtrierte Acetonlösung hinterliess beim Eindampfen nur Spuren von braunen Flöckchen, deren Biuretreaktion negativ ausfiel. Der in Aceton unlösliche Rückstand war reine Amib. Zum gleichen Resultat führte ein Versuch mit 1g Amib + 10g Tetralin + 0,5g Glyzerin (21^h, 160°C).

3.) 1g Amib + 30 ccm Xylol. Für die folgenden Versuche wurde frisch destilliertes Xylol ohne, bzw. mit 1g Glyzerinzusatz verwandt. Ein langsam durch das Reaktionsgemisch gesogener, vollständig trockener Luftstrom (1 Blase/Min.) sollte dafür sorgen, dass etwa durch Abspaltung entstandenes H_2O sofort entfernt worden wäre. Nach 34^h bei 130°C (bei Glyzerinzusatz nach 45^h bei 130°) war die Lösung dunkelbraun geworden. Sie wurde abgegossen und der Rückstand ausgeäthert und mit wenig Alkohol gewaschen. Letzterer hatte wieder dieselben Eigenschaften wie das Ausgangsprodukt. Weder die Lösung (kein Rückstand beim Eintrocknen) noch der Rückstand gaben eine positive Biuretreaktion.

4.) 1g Amib + 25 ccm i-Amyläther. Ebensowenig Erfolg hatte eine andere Anordnung zur Entfernung des sich eventuell abspaltenden H_2O. Die zu diesem Zweck benützte Apparatur bestand aus einem Destillierkolben mit dem Reaktionsgemisch, welcher seitwärts versetzt einen Rückflusskühler mit darunter befindlichem Ueberlaufgefäss besass. In letzteres wurde nun Na-Metall gelegt, welches das aus dem Kolben abdestillierte und durch den Rückflusskühler wieder kondensierte H_2O binden sollte, so dass stets trockenes Xylol in den Kolben zurückfliessen musste. Nach 18-stündigem Sieden (175°) hatte sich

der Amyläther gelblichbraun verfärbt. Nach dem Filtrieren destillierte er ohne Rückstand. Der weisse Bodenkörper bestand aus reiner Amib. Das Na im Ueberlaufgefäss war noch unverändert.

5.) 1g Amib + 50 ccm Chlorbenzol. Dieses Reaktionsgemisch, ohne oder mit 1g Glyzerin, sollte im Soxlethapparat erhitzt das eventuell abgespaltene H_2O an Na abgeben, welches an Stelle der Hülse eingelegt wurde. Nach 31-stündigem Sieden bei 132°C hatte sich das Chlorbenzol gelb verfärbt. Die festen Anteile waren auch hier weiss geblieben und bestanden aus Amib. Das Na hatte nur eine dünne, gelbliche Kruste erhalten. Aus dem filtrierten Chlorbenzol hinterblieb beim Destillieren kein Rückstand.

Bei keinem dieser Versuche waren somit Biuretkörper festgestellt worden. Eine merkbare Neigung der Amib zu Kondensationsreaktionen ist also unter den angegebenen Bedingungen nicht vorhanden; höchstens Diketopiperazin entsteht in Spuren.

Ebensowenig führt Erhitzen des Aethylesters der Amib in offenen Gefässen zu Peptiden; denn unter 140° verändert er sich nicht merklich und darüber zersetzt er sich zu braunen Schmieren mit negativer Biuretreaktion.

Versuche in geschlossenen Röhren.

Die dazu benützten schwerschmelzbaren Glasröhren hatten eine Wandstärke von ca 2mm, einen inneren Durchmesser von ca 20mm und eine Länge von ca 400 mm. Als Füllung wurde höchstens 5g Amib gebraucht; denn bei den angewandten hohen Temperaturen entstand fast immer viel Gas, wodurch besonders beim raschen Anheizen die Rohre zertrümmert wurden (günstig 100°/Min.). Beim Zuschmelzen wurden die Rohre zu 15cm langen, dickwandigen Kapillaren mit ca 0,3 mm Durchmesser ausgezogen, damit nach dem Erhitzen beim Abklemmen der Kapillarspitzen nur ein allmählicher Druckausgleich möglich war. So liess sich

das Gas auffangen und analysieren.

1.) Es war aussichtslos die Amib durch Erhitzen im Rohr auf weniger als 200°C kondensieren zu wollen. Auch nach 64-stündiger Einwirkungszeit war sie noch unverändert oder enthielt höchstens Spuren von Diketopiperazin. Beim Oeffnen entwichen keine merkbaren Gasmengen. Bei Temperaturen zwischen 200 und 300° blieb dann ein kleinerer Teil unangegriffen. Es entstanden mehr Diketopiperazin (vgl. Seite 22) und daneben geringe Mengen einer braunen, kollidinähnlich riechenden Flüssigkeit. Durch letztere erhielten die im ganzen Rohr verteilten, teils an den Wänden anliegenden, teils durch den Hohlraum schief hindurchgewachsenen Kristallnadeln von Amib und Diketopiperazin ein gelbes bis braunes Aussehen. Beim Oeffnen entwich längere Zeit Gas. Anfängliches Evakuieren der Rohre brachte kein neues Resultat. Von 300° an war schon nach 4 Stunden keine Amib mehr nachzuweisen. Dafür füllten viele Diketopiperazinnadeln und wenig gelbe bis braune, flüssige Anteile das Rohr. Letztere entstanden in vermehrtem Masse beim Erhitzen über 20^{h}. In keinem der genannten Fälle konnten aber biuretpositive Substanzen festgestellt werden.

2.) Interessanterweise bildete sich die erwähnte braune Flüssigkeit in grösserer Menge schon nach 3 Stunden, wenn die Amib Spuren von NH_4Cl enthielt.* Bei einem Zusatz von 1% NH_4Cl entstand noch mehr. Sobald jedoch zuviel NH_4Cl zugegeben wurde (50%), trat an Stelle der Flüssigkeit eine C- + H-haltige lockere, schwarze Masse auf, deren Biuretreaktion ebensowenig positiv war wie diejenige der Flüssigkeit. (vgl. dazu Tab. 1). Beim Oeffnen der Rohre war der Druck nicht sehr gross. Das ausströmende Gas hatte einen kollidinähnlichen Geruch. Es bestand ebenso wie das unter 1) erhaltene aus: CO_2, CO, NH_3, Spuren von Kohlenwasserstoffen und Luft. Der Rohrinhalt wurde jeweils mit Aether extrahiert, worauf der fast farb-

*Von der Darstellung herrührend.

lose Rückstand aus Alkohol umkristallisiert wurde. Er war jetzt ganz weiss und enthielt nur Diketopiperazin (Ausnahme Versuch 4, Tab. 1).

Tab. 1. Amib + NH_4Cl beim Erhitzen im Einschlussrohr.

Versuch No.		1	2	3	4
Amib	g	1	2	3	0,5
NH_4Cl	g	-	Spur	0,03	0,5
Erhitzungsdauer	h	24	24	6	24
Temperatur ca	°C	330	330	330	330
Inhalt n. Erhitzen:					
Amib		-	-	-	-
Diketopiperazin	g	+	+	1,35	+
and. fest. Anteile		-	-	-	NH_4Cl + schw. M.
Gas		+	+	+	+
Flüssigkeit	ccm	1/10	1/2	1,5	-

Das Extrakt begann, nach Entfernung des Aethers im Vakuum, bei 195°C/715 mm Hg zu sieden. Von 2 ccm der gesammelten Flüssigkeit liessen sich 0,8 ccm bei 80-120°C/10mm Hg abdestillieren als gelbes Oel, welches bei erneuter Destillation zwischen 92-95°C/11mm Hg als hellgelbes Oel überging. Der schwarze, flüssige Kolbenrückstand destillierte auch bei einer Badtemperatur von 310° noch nicht. Beim Abkühlen wurde er dann fest.

Das erhaltene hellgelbe 2. Destillat hatte nur noch einen schwach kollidinähnlichen Geruch. Beim Aufbewahren an der Luft verfärbte es sich bald. Es ist, im Gegensatz zur ursprünglichen Flüssigkeit, frei von NH_3. Sein p_H ist in wässriger Lösung 7,5, sein Geschmack brennend. Mit HCl entwickeln sich sofort Nebel. Die Flüssigkeit und ihre Destillate sind wenig löslich in H_2O, aber gut in HCl. Aus letzterer werden sie durch Zugabe von NaOH wieder gefällt. Die Isonitrilreaktion des Destillates ist positiv (prim. Amin). Es lässt sich diazotieren und kuppeln. Die Berlinerblaureaktion wird stark positiv (N). Es ist stark ungesättigt; denn es entfärbt sofort viel $KMnO_4$-Lösung oder Br-Wasser in der Kälte. Mit Fichtenspahn + HCl konz. tritt langsam Rotfärbung ein.

Es handelt sich hier wahrscheinlich um ringförmige, primäre und ungesättigte Amine, vielleicht Pyridinhomologe. Eine Entstehung solcher Verbindungen ist z.B. auch durch Polykondensation von NH_3 und Aldehyden bekannt geworden. Die letztgenannten Stoffe könnten durch oxydative Desaminierung von Aminosäuren gebildet werden.[105,106] Oelartige Nebenprodukte sind auch von andern Forschern[96] bei der Erhitzung von Aminosäuren oder deren Derivaten beobachtet worden.[66] Im hier besprochenen Fall dürfte das z.T. dissoziierte NH_4Cl die Rolle eines Katalysators spielen. Die Flüssigkeit ist jedenfalls nicht aus dem Diketopiperazin entstanden; denn dieses erfährt beim Erhitzen auf die gleichen Temperaturen keine Aenderungen.

3.) lg Amib + lg Glyzerin. Beim 7-stündigen Erhitzen dieses Gemisches im geschlossenen Rohr auf 300°C konnten, ausser den schon beschriebenen, keine andersartigen Produkte gefasst werden. Das Glyzerin hatte sich hellbraun verfärbt, während es bei den Versuchen in offenen Gefässen schwarz geworden war. Als spezifisch schwerer lag es unter der hier ebenfalls gebildeten dunkelbraunen Flüssigkeit.

4.) Amib-äthylester. (vgl. Seite 22). Beim Erhitzen dieses Esters im Rohr auf 100° bildete sich nach 20^h etwas Diketopiperazin, während der übrige Anteil aus fast farblosem, unverändertem Ester bestand. Eine Vermehrung der Diketopiperazinnadeln trat ein nach 24-stündigem Erhitzen auf 110-120°. Diese Menge erhöhte sich dann auf ein Zehntel des angewandten Esters bei Steigerung der Temperatur auf 170° (9^h), wobei der restliche Ester gelbbraun geworden war. Beim Oeffnen war kein Druck feststellbar. H_2O wurde, infolge der NH_3-Absorption, hineingesogen. Bei 205° endlich verwandelte sich nach 7^h der grösste Teil des Esters in Diketopiperazin. Auch hier trat nirgends eine positive Biuretreaktion auf. Entweder blieb der Aethylester unverändert oder er ging unter Alkoholabspaltung in das Diketopiperazin über.

2. ERHITZEN VON AMIB MIT ESSIGSAEUREANHYDRID.

Es wurde bereits Seite 5 erwähnt, dass aus Amib beim Erhitzen mit Essigsäureanhydrid unter geeigneten Bedingungen unlösliche Körper von möglicherweise polymerem Charakter entstehen.[21] Im Rahmen unserer Problemstellung war es wertvoll diese Beobachtungen zu erweitern. Aus dem bisher Bekannten geht nämlich nicht sicher hervor, um welche Verbindungen es sich bei den unlöslichen Anteilen handelt. Erschwerend für die Aufklärung ihrer Bildungsweise wirkt nämlich der Umstand, dass die Azetylierung nicht eindeutig verläuft.[21,22] Je nach Einwirkungsdauer treten weiterlaufende Kondensations- oder wieder Zersetzungsreaktionen auf. Ueber ähnliche Beobachtungen berichteten übrigens schon Landsteiner und Prasek, welche aus Eiweiss, nach längerer Behandlung mit Essigsäureanhydrid, ausser Azetylderivaten noch verschiedenartige Zersetzungsprodukte feststellten.[10]

Die genannten unlöslichen Körper fanden Levene und Steiger als sie Peptide der Amib nach dem Azlaktonverfahren herstellen wollten. Gingen sie dabei von reiner Amib aus, welche sie mit überschüssigem Essigsäureanhydrid ohne Zusatz von Siedesteinchen $\frac{1}{2}^h$ am Rückflusskühler kochten, so erhielten sie nur das gewünschte Azlakton. Erst beim Zusatz von Siedesteinchen oder von Spuren NH_4Cl (letzteres von der Amib-Darstellung herrührend) zum Gemisch von 0,1 Mol Amib + 0,5 Mol Essigsäureanhydrid wurden in Xylol und H_2O unlösliche Produkte erhalten (0,4 - 0,7% der Einwage an Amib). Auf Grund von Elementaranalysen vermuteten die Autoren, dass es sich dabei um azetylierte Peptide handle (s. Tab. 2). Die Werte entsprachen etwa dem Oktapeptid, doch sind bei dem einen unlöslichen Produkt sowohl der H- als auch der N-Gehalt dafür zu niedrig.

In eigenen Versuchen wurde nun zuerst geprüft, unter welchen Bedingungen

Tab. 2. Elementaranalysen der unl. Produkte aus Amib + Essigsäureanhydrid.

Substanz	C %	H %	N %	Nach:
Unl. Prod. mit NH_4Cl	55,36	7,77	14,62	Levene[21]
	55,31	8,07	14,53	"
" " " Siedestein	55,06	8,20	15,09	"
	55,10	8,16	15,14	"
" " extrahiert	48,34	8,45	13,64	eigene Versuche
	48,56	8,65	13,79	" "
Amib zum Vergleich	46,57	8,73	13,58	
Amib (azetyliert)	49,63	7,64	9,64	
Di- peptid (" (	52,14	7,88	12,17	
Tri- " (")	53,30	8,00	13,33	
Tetra- " (")	53,98	8,06	14,01	
Penta- " (")	54,39	8,10	14,43	
Hexa- " (")	54,70	8,13	14,73	
Hepta- " (")	54,92	8,15	14,96	
Octa- " (")	55,09	8,17	15,13	
Nona- " (")	55,24	8,18	15,27	
Deca- " (")	55,34	8,19	15,38	

am meisten unlösliche Produkte ausfielen. Die dazu verwandte Amib enthielt Spuren NH_4Cl. Es zeigte sich folgendes: 1. Das Verhältnis von Amib : Essigsäureanhydrid durfte zwischen 1:1 und 1:5 variieren, ohne dass die Ausbeute an unlöslichen Produkten wesentlich änderte. 2. Nach ½-1^h erhitzen fiel am meisten aus, bis 5%. 3. Weitererhitzen der Filtrate ergab nur eine geringe Zunahme (1%) der unlöslichen Produkte. 4. Ihre Menge vergrösserte sich nicht bei Anwesenheit von mehr NH_4Cl.

Die Ausbeute an unlöslichen Produkten stieg jedoch sofort bis auf 50% der Einwage an Amib als ein Gemisch im Verhältnis von 1:1,5 Mol nicht offen, sondern ½-1½^h im Einschlussrohr auf 150°C erhitzt wurde. Fast 100%ig wurde sie dann beim Molverhältnis 1:0,7. Die auf diese Art erhaltenen Produkte wurden gesammelt und nach dem Waschen mit Xylol folgendermassen behandelt: 4^h mit Aether extrahiert, um Reste von Essigsäureanhydrid und Essigsäure herauszulösen; 4^h mit Alkohol extrahiert, um eingeschlossenes Lakton und N-azetylamib zu entfernen; 4^h mit 50% wässrigem Alkohol extrahiert, um nicht umge-

setzte Amib zu entfernen. Die Extraktrückstände enthielten alle N-azetylgruppen.* Sie gaben ferner positive Biuretreaktionen und zwar diejenigen aus Aether am stärksten, die aus Alkohol schwächer. Reaktionen auf Amib waren negativ.

Der Extraktionsrückstand enthielt ebenfalls N-azetylgruppen (p_H in H_2O 5), gab aber keine deutliche Biuretreaktion mehr. Er enthielt Amib. Dies ging aus den chemischen Reaktionen und besonders deutlich aus einer Debye-Scherrer-Aufnahme hervor, welche die gleichen Interferenzen wie die Amib aufwies. Bei der genauen Betrachtung ihrer Fotometerkurve (Fig. 15) mit derjenigen der reinen Amib (Fig. 14) fiel auf, dass die Linie 1 nach links verbreitert war und sich die Linien 2, 3, sowie 5-8 verbreitert hatten und gleichzeitig ein anderes Intensitätsverhältnis aufwiesen. Der Extraktionsrückstand musste demnach noch Substanzen enthalten, welche dieselben Halos gaben wie die Polypeptide der Amib (Fig. 16). Aus der Elementaranalyse konnte ebenfalls abgeleitet werden, dass er aus einem Gemisch von Amib + N-azetylierten, niederen Peptiden bestehen musste (vgl. Tab. 2). Mögliche Zusammensetzung z.B.: 2 T Amib + 1 T N-azetyliertes Tripeptid. Durch 63-stündige Extraktion mit H_2O-Alkoholgemischen liess sich dann der Extraktionsrückstand vollständig in lösliche Produkte überführen, in welchen die Mengen an Amib zugenommen hatten. Dies hing mit der durch N-Azetylgruppen erleichterten hydrolytischen Aufspaltbarkeit von Peptiden zusammen.[21]

Man erhält also durch Einwirkung von Essigsäureanhydrid auf Amib niedere, azetylierte Peptide, welche schon durch Alkohol (noch leichter durch Eisessig) wieder zur Aminosäure aufgespalten werden. Diese Methode ist somit ebenfalls ungeeignet, um höherpolymere, reine Peptide zu gewinnen.

*Nachweis: Abspaltung der Essigsäure mit 50% H_2SO_4. Essigsäurenachweis durch Kakodylreaktion, ferner mit $La(NO_3)_3$ + J + NH_3 und durch p_H der H_2O-Lösung.

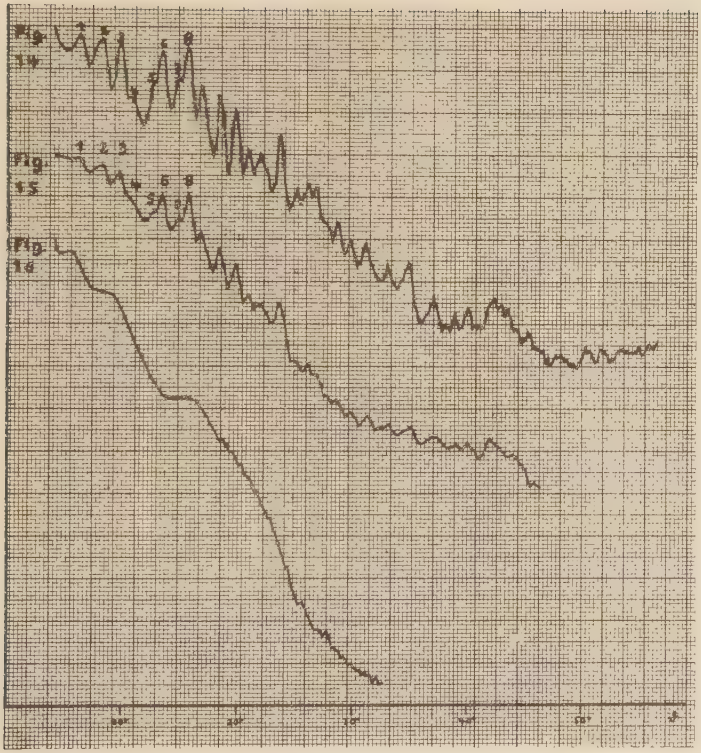


Fig. 14
Fig. 15
Fig. 16

3. PEPTIDE AUS 2-AMINO-ISOBUTTER-N-CARBONSAEUREANHYDRID.

Allgemeines.

Gelang es mit Hilfe der bisher erwähnten Methoden nicht Peptide der Amib unter H_2O-Abspaltung direkt aufzubauen, so durfte dagegen im voraus mit ziemlicher Sicherheit erwartet werden, dass solche aus dem N-Carbonsäureanhydrid der Amib herstellbar sein würden. Diese Hoffnung stützte sich auf die Tatsache, dass aus allen bisher bekannten N-Carbonsäureanhydriden von Aminosäuren leicht Polymere von peptidartigem Charakter gewonnen werden konnten.[108] Dabei gingen die sehr reaktionsfähigen Ausgangsmoleküle unter den verschiedensten Bedingungen in polymere über. In Tabelle 3 ist dies kurz zusammengestellt.

Tab. 3. Bildungsbedingungen von Peptiden aus N-Carbonsäureanhydriden.

Bedingungen	Entstehende Produkte	Lit.
Erhitzen	Peptide, Wegsubl. v. N-carbs.-anhydrid	36 -38
Verreiben m. wenig H_2O 20°C	Peptide	40
Versetzen m. viel " 15°	Aminosäure	36 -38
Stehen m. n/1000 - n/10 HCl	Peptide	12
" m. stärkerer HCl	Aminosäure.HCl	12
" m. n/1000 - n/10 NaOH	Peptide	12
" m. stärkerer NaOH	Aminosäure	12
" m. H_2O-halt. org. Lsgm	Peptide	36 -38
Versetzen m. Aminosäuren	Peptide	12, 40
" m. Anilin	Peptide oder (und) Anilide	39, 40
" m. Pyridin	Peptide und andere Derivate	33, 41
Kochen in abs. Alkohol	Peptide, Ester	36 - 38, 12

Besonders einfach ist wohl ihre Zersetzung beim Erhitzen: Zuerst werden unter CO_2-Abspaltung wahrscheinlich Radikale $-NH-C(R_1R_2)-CO-$ gebildet, die leicht polymerisieren. Dabei ist möglich, dass die Endgruppen teilweise unter H_2O-Aufnahme aus der Luft abgesättigt werden, was zu normalen Peptidketten führen müsste. Ausserdem könnten aber auch die restlichen, unabgesättigten

Anteile zyklisieren, womit prinzipiell ketten- und ringförmige Produkte zu erwarten sind.

Ueber die CO_2-Abspaltung berichtete schon Leuchs, dass sie beim Behandeln der N-Carbonsäureanhydride mit Feuchtigkeit oder beim Erhitzen in absolutem Alkohol fast 100%ig war.[36-38]

Auch über die Konstitution der Reaktionsprodukte wurden damals bereits Meinungen geäussert. Leuchs war auf Grund ihrer Unlöslichkeit in Säuren und Basen der Auffassung, dass es sich hier um polymere Modifikationen eines 3-gliedrigen Ringes $\left[\overline{NH\text{-}C(R_1R_2)\text{-}CO}\right]_n$ handle und eine Peptidverkettung unwahrscheinlich sei. Auch das Vorhandensein von NH_2- oder COOH-Gruppen glaubte er absprechen zu müssen. Wessely konnten dann dieses Problem trotz umfangreicher Versuche nicht einwandfrei klären. Nach Veröffentlichung zweier Arbeiten[32,40] bemerkte er[41], dass alle Untersuchungen am Polykondensationsprodukt aus Glycin-N-carbonsäureanhydrid infolge der unangenehmen Löslichkeitseigenschaften scheiterten. Später ist es ihm immerhin gelungen aus andern N-carbonsäureanhydriden auch lösliche Anteile zu gewinnen, welche aus niederen Peptiden bestanden. Also entstehen z.T. offenkettige Produkte. Damit war jedoch die Struktur der unlöslichen Anteile noch nicht bestimmt.

Nach Wessely sind wenigstens im Glykokollkondensat keine Diketopiperazine enthalten. Einzig von einem Polykondensat aus Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid erhielt er bei der Sublimation Sarkosindiketopiperazin (85,7%)[41], das sich aber auch erst bei dieser Operation gebildet haben konnte. Ein Debye-Scherrer-Diagramm des Polykondensates hätte darüber Bescheid gegeben. Solche Röntgenuntersuchungen sind aber erst von Meyer und Go[33] auf Glykokollpolymere angewandt worden, wobei nur Formen mit schwach kristallinischen Bezirken gefunden wurden (Diketopiperazine hätten deutliche Interferenzen gegeben).

Wessely erwog auch die Bildungsmöglichkeit von Harnstoffderivaten aus

N-carbonsäureanhydriden, verwarf sie aber wieder, weil dann die abgespaltene CO_2-Menge nicht 98-100% der für das Polyanhydrid berechneten betragen hätte.

Somit blieb noch zu entscheiden, ob ringförmige oder offenkettige Produkte vorlagen. Dazu genügte aber eine Elementaranalyse allein nicht; denn die Prozentzusammensetzung beider wird mit höher werdendem Kondensationsgrad immer ähnlicher. Nun war aber diese, je nach Herstellungsbedingungen, überhaupt verschieden. In Tabelle 4 sind solche Werte von Glykokollpolykondensaten eingetragen. Sie deuten auf wechselnde Zusammensetzung hin. Allerdings enthielt 2b noch Aminosäure, was eventuell auch bei 2a der Fall war, womit eine Mischung von Glykokoll mit Polykondensat denkbar ist. Nach Reaktion 5 und 6 wurden ähnliche Substanzen erhalten wie bei 1-4. Dabei waren dieselben Strukturfragen von Maillard[43] zugunsten einer Anhydridform diskutiert worden. Aus der Schwerlöslichkeit von Peptiden kann man aber noch nicht auf die Existenz von ringförmigen Verbindungen schliessen.[34]

Im Sinne offener Peptidketten sprechen dann die Arbeiten von Meyer[33] und von Freudenberg.[46] Beide bestimmten im Glykokollpolykondensat den Aminostickstoff nach van Slyke. Meyer arbeitete mit einem Polykondensat, das er direkt aus Glykokoll-N-carbonsäureanhydrid erhalten hatte, Freudenberg mit einem aus

Tab. 4. Elementaranalysen von auf verschiedenen Wegen erhaltenen Glykokollpolykondensaten (Gl = Glykokoll, Gl-E = Gl-Ester, Gl-N = Gl-N-carbons.anhydr.).

Nr.	Aus	Durch	C %	H %	N %	Lit.
1	Gl-N	feuchte Luft	41-42	5,4	23-24	12
2a	Gl-N	H_2O, direkter Niederschlag	39,8	5,69		12
2b	Gl-N	Nied. aus Filtrat von 2a	34,8	6,98		12
3	Gl-N	Kochen mit Alkohol	41,80	5,30	24,20	36
4	Gl-N	Behandeln mit Pyridin	42.41	5,68	24,30	41
5	Gl	offen Erhitzen m. H_2O + Glyzerin	41,24	5,48	23,67	13
6	Gl	Erhitzen im Rohr m. " + "	41,90	5,77	24,09	11
7	Gl-E	Erhitzen " "	42,28	6,67	20,64	31
Zum Vergleich:		Glykokoll	31,98	6,72	18,66	
		Glykokolldipeptid	36,34	6,06	21,20	
		Glykokolltripeptid	38,08	5,86	22,22	
		Diketopiperazin des Glykokolls	42,10	5,25	24,56	

H_2SO_4 umgefällten Produkt. Sie fanden 0.72, bzw. 2.7% Aminostickstoff entsprechend einem Durchschnittmolekulargewicht von 2000, bzw. 450. Werte in der gleichen Grössenordnung erhielten in letzter Zeit auch Go und Tani.[109] Das Vorhandensein von Aminostickstoff beweist, dass offene Ketten am Aufbau beteiligt sind. Aminosäure als Ursache für die positiven van Slyke-Werte anzunehmen ist nicht angängig, einmal wegen der Aufarbeitung des Materials, bei der sie entfernt worden wäre und 2. war sie nicht nachweisbar im Röntgendiagramm. Die Polykondensate wurden erwartungsgemäss durch H_2SO_4 (auch durch HCl)[12] abgebaut, deshalb musste die Menge des Aminostickstoffes beim umgefällten Produkt steigen. Entsprechend wurde auch die H_2O-Löslichkeit grösser und parallel dazu trat die Biuretreaktion rascher und intensiver ein.*

Auch Wessely[47] hat Molekulargewichtsbestimmungen durchgeführt und zwar an H_2O-löslichen Sarkosinpolykondensaten nach der Methode von Barger-Rast oder in Phenol. Er erhielt bei einem Produkt, welches er aus Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid mit H_2O gewonnen hatte, stark schwankende Werte zwischen 300-800 nach Barger-Rast und 349 in Phenol. Kryoskopische Bestimmungen versagen jedoch bei grösseren Molekülen. Aus diesen Zahlen und aus dem Gehalt an Aminostickstoff der oben erwähnten umgefällten Produkte ist lediglich zu entnehmen, dass solche wasserlöslichen Peptide ein Molekulargewicht zwischen etwa 300-2000 haben. Die unlöslichen Polykondensate sind wahrscheinlich höhermolekular. Mit ihnen können erst Molekulargewichtsbestimmungen durchgeführt werden, wenn es gelingt ein geeignetes Lösungsmittel zu finden. Alle bisherigen Versuche[5] ergaben aber, dass sie höchstens bis zu einigen Prozenten in konzentrierten, wässrigen $ZnCl_2$- oder LiBr-Lösungen[33], ferner in Schweizersreagens, in konzentrierter HCl löslich sind und einzig in konzentrierter H_2SO_4 vollständig gelöst werden. Doch haften allen diesen Lösungsmitteln Nachteile an wie: Schwie-

*Dies ist jedoch kein Beweis, dass das Polykondensat nur aus offenen Peptidketten bestanden haben muss; denn auch ringf. Prod. können durch hydrolyt. Agentien aufgespalten werden, wodurch z.B. der Aminostickstoff steigt.

rige Entfernung (z.B. Cu bei Schw.-Reagens), Zähflüssigkeit ($ZnCl_2$, LiBr), Abbau der Peptide (Mineralsäuren). Den beiden letztgenannten Nachteilen ist es zuzuschreiben, dass viskosimetrische Messungen zur Ermittlung des Molekulargewichtes bisher erfolglos geblieben sind.

Auf eine Eigenschaft der unlöslichen Anteile sei noch hingewiesen: Oefters war bei ihrer Darstellung von gallertigen Niederschlägen die Rede.[33] Ferner wurden manchmal aus löslichen Anteilen glänzende, zerspringende Filme[33] erhalten. Wahrscheinlich stehen diese Beobachtungen im Zusammenhang mit Kolloideigenschaften solcher Peptide.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass aus N-carbonsäureanhydriden von Aminosäuren ohne grosse Schwierigkeiten Peptide erhalten werden, deren wasserlösliche Anteile einen Polymerisationsgrad von etwa 10-20 aufweisen und deren unlösliche Anteile einen noch unbekannten, wahrscheinlich höheren, Polymerisationsgrad besitzen. Ihre Zusammensetzung ist je nach den Herstellungsbedingungen wechselnd und noch nicht näher bestimmt.

Darstellung von Peptiden aus 2-Amino-isobutter-N-carbonsäureanhydrid.

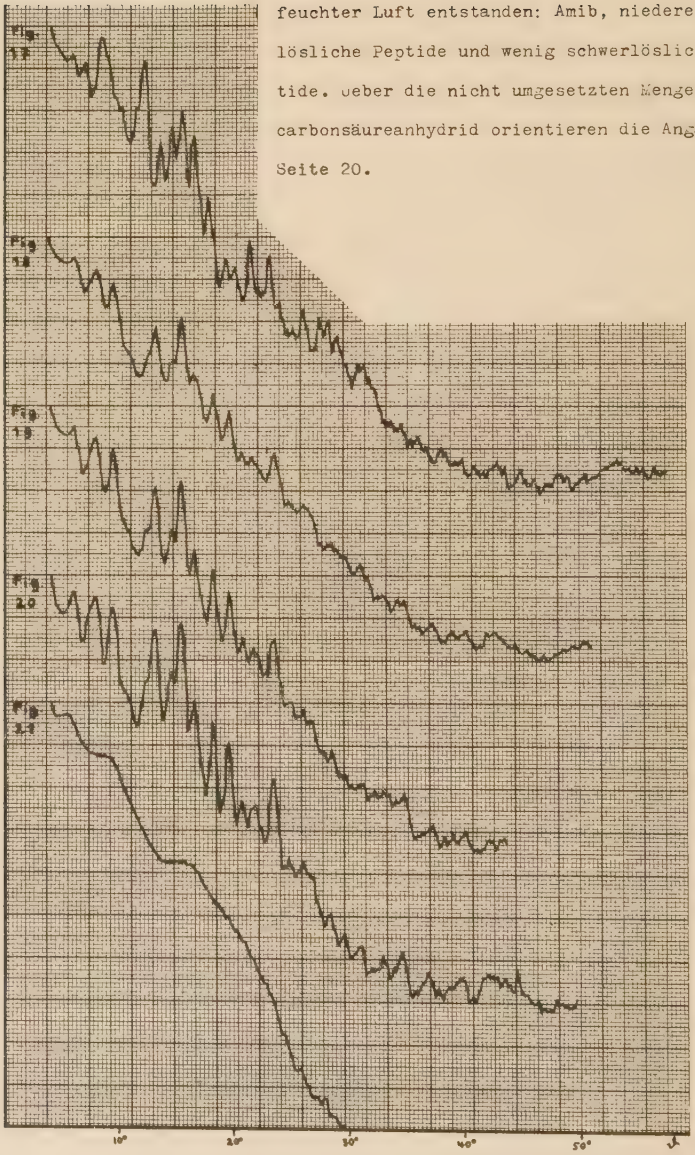
1. Allgemeines. Auf Seite 20 wurde bereits die leicht erfolgende Bildung von unlöslichen Polykondensaten aus dem N-carbonsäureanhydrid der Amib beschrieben. Tatsächlich reiht sich das chemische Verhalten dieser Verbindung ganz ein in dasjenige schon bekannter N-carbonsäureanhydride anderer Aminosäuren (vgl. dazu Tab. 3). So entstehen, wo H_2O anwesend ist, stets Amib und, je nach H_2O-Menge, unlösliche, biuretpositive Polykondensate. Dieselben Zersetzungsprodukte konnten festgestellt werden bei der Einwirkung von Anilin auf das N-carbonsäureanhydrid. Wurde es mit absolutem Alkohol erhitzt, so trat bald der Geruch nach Amib-äthylester auf, während nur wenig Unlösliches ausfiel. Einzig beim Erhitzen über den Schmelzpunkt gelang es unlösliches Mate-

rial zu gewinnen, das jedenfalls keine Amib enthielt. Dieses letztere Verfahren wurde daher herangezogen zur Herstellung grösserer Mengen von Peptiden.

2. Verhalten des N-carbonsäureanhydrides der Amib beim Zutritt von Luftfeuchtigkeit. Hierüber wurde auf Seite 22ff. berichtet, dass sich die reine Verbindung an der Luft bald zu zersetzen beginnt. Merkmale dieser Zersetzung sind: a.) Steigender Schmelzpunkt unter gleichzeitger Verminderung der schmelzbaren Anteile. Beim höheren Erhitzen sublimiert ein geringer Teil zwischen 215-280°, darüber verkohlt der Rest unter gleichzeitiger Destillation von braunen Flüssigkeitströpfchen. b.) Abnehmende Löslichkeit in Aceton, Essigester, Benzol, Anilin, H_2O. c.) Zunahme vom p_H 3 gegen 7 (z.B. 1-jähriges Präparat 6,3). d.) Veränderung des säuerlich-bitteren Geschmackes in einen süssen. e.) Positiv-werden der Biuretreaktion. f.) Undurchsichtig-werden der anfänglich klaren Kristalle, wobei die Substanz ein körniges, blättriges Aussehen erhält (vgl. Figg. 4,6). g.) Abnehmende Zahl doppelbrechender Kristalle im polarisierten Licht. h.) Verschwinden der ursprünglichen Gitterinterferenzen in Debye-Scherrer-Diagrammen und Auftreten derjenigen der Amib.

Im letztgenannten Fall treten die Unterschiede deutlich hervor bei der Gegenüberstellung der entsprechenden Fotometerkurven: Figur 18 zeigt eine solche eines 1-jährigen, an der Luft aufbewahrten Präparates, die keine Aehnlichkeit mehr mit derjenigen des ursprünglichen N-carbonsäureanhydrides (Fig. 17) zeigt. Die Interferenzlinien entsprechen vielmehr der Fotometerkurve der Amib (Fig. 20), doch sind sie überlagert (vgl. S. 24, 39) von den Polypeptidhalos der Amib (Fig. 21 zeigt solche Polypeptide). Nach Behandlung des 1-jährigen Präparates mit der 100-fachen Menge H_2O bei 20° zeigte sich dann tatsächlich, dass darin ausser 86% eines H_2O-löslichen Gemisches von Amib mit niederen Peptiden (Biuret ++) noch 14% unlösliche, höhere Peptide (Biuret langsam +) enthalten waren.

Aus dem N-carbonsäureanhydrid der Amib sind demnach beim Aufbewahren an



feuchter Luft entstanden: Amib, niedere, H_2O-lösliche Peptide und wenig schwerlösliche Peptide. Ueber die nicht umgesetzten Mengen an N-carbonsäureanhydrid orientieren die Angaben auf Seite 20.

3. Veränderung des N-carbonsäureanhydrides in H_2O. Mit Spuren H_2O, z.B. in H_2O-haltigen Lösungsmitteln, zersetzte es sich innert kurzer Zeit. So zeigte ein Niederschlag, der sich während des Umkristallisierens der Verbindung aus feuchtem Benzol gebildet hatte, die gleichen Eigenschaften wie ein längere Zeit an der Luft aufbewahrtes Präparat. Hier war aber durch die Behandlung mit Benzol alles unveränderte Ausgangsmaterial entfernt worden. Die Fotometerkurve vom Debye-Scherrer-Diagramm des Niederschlages (Fig. 19) deutete auf einen noch grösseren Amid-Gehalt hin als in Figur 18. Eine Elementaranalyse bestätigte dann, dass er vorwiegend aus Amid und niederen Peptiden bestand (C = 48.16%, H = 8.61%, vgl. dazu Tab. 6).

Aehnliche Reaktionen spielten sich ab, als das N-carbonsäureanhydrid mit 96-99%igem Alkohol während 40^h am Rückflusskühler erhitzt wurde. Neben etwas Amid-äthylester, kenntlich am Geruch, und wenig Diketopiperazinnadeln entstanden Amid und Peptide. Letztere waren sowohl im geringen Niederschlag (1%), als auch in der biuretpositiven Alkohollösung enthalten. Erhitzen im absoluten Alkohol brachte keinen vermehrten Peptidniederschlag.

Wurde das N-carbonsäureanhydrid endlich in der 20-fachen H_2O-Menge aufgelöst, so entwickelte sich bei Zimmertemperatur CO_2. Lösung und Rückstand enthielten zuletzt nur Amid.

4. Rasches Erhitzen des N-carbonsäureanhydrides. Beim schnellen Erhitzen auf 150-200°C wurde die anfänglich klare Schmelze schon nach einer Minute fest (vgl. S. 19). Die sofort wieder abgekühlte Masse enthielt viel niedere (Biuret ++, H_2O-löslich) und wenig höhere (Biuret langsam +, H_2O-unlöslich)* Peptide. Beim Versetzen der Masse mit H_2O entstand aus dem nicht umgesetzten Ausgangsprodukt Amid.

*Wie sich bei den im folgenden beschriebenen Polykondensaten an Hand von Elementaranalysen erwies, haben wasserlösliche Peptide der Amid nur einen geringen Polykondensationsgrad.

Tab. 5. Elementarzusammensetzungen der Polykondensate aus 2-Amino-isobutter-N-carbonsäureanhydrid.

Nr.	Herkunft	C %	H %	N %
1	Aus N-carbons.anhydr. der Amib mit wasserhaltigem Benzol	48.14 48.18	8.66 8.56	
2	Aus N-carbons.anhydr. der Amib durch langsames Erhitzen über den Schmelzpunkt	53.68	7.65	15.49 15.43
3	do. (anderer Versuch, Näheres s. später) (vgl. Tab. 7)	53.47 53.68	7.90 7.87	
3a	Alkoholextrakt von Nr. 3 (vgl. Tab. 10, 11)	52.28	7.50	
3b	Extraktionsrückstand davon	55.14 55.43	8.26 8.29	
3c	Essigesterextrakt von Nr. 3 (s. Tab. 10-11)	52.26	7.90	
3d	Extraktionsrückstand davon	55.46	8.32	
3e	Nr. 3 in H_2SO_4 gelöst + H_2O + $Ba(OH)_2$, Rückstand aus Filtrat (vgl. Tab. 9)	52.86 52.62	8.39 8.41	
3f	Nr. 3 in H_2SO_4 gelöst + NH_3 + H_2O: Fällung	55.75	8.24	
3g	Filtrat von 3f eingedickt: neue Fällung	54.38	8.51	
3h	Filtrat von 3g + $Ba(OH)_2$: Rückst. aus Filtrat	52.52 52.64	8.39 8.41	

	Peptide der Amib			Peptid-N-carbonsäureanhydride der Amib		
Po	C %	H %	N %	C %	H %	N %
1	46.57	8.73	13.58	46.49	5.42	10.85
2	51.02	8.57	14.89	50.44	6.59	13.08
3	52.69	8.48	15.38	52.16	7.08	14.05
4	53.57	8.44	15.64	53.11	7.35	14.59
5	54.14	8.41	15.81	53.71	7.52	14.39
6	54.51	8.40	15.92	54.12	7.64	15.14
7	54.75	8.38	15.99	54.43	7.73	15.33
8	54.97	8.37	16.04	54.67	7.78	15.47
9	55.13	8.36	16.09	54.86	7.85	15.57
10	55.26	8.35	16.13	55.00	7.89	15.66
11	55.36	↓	↓	↓	↓	↓
12	55.45	↓	↓	↓	↓	↓
13	55.53	↓	↓	↓	↓	↓
14	55.59	↓	↓	↓	↓	↓
15	55.65	↓	↓	↓	↓	↓
16	55.69	↓	↓	↓	↓	↓
17	55.74	↓	↓	↓	↓	↓
18	55.77	↓	↓	↓	↓	↓
19	55.81	↓	↓	↓	↓	↓
20	55.84	8.33	16.29	56.04	8.14	16.06
⋮	↓	↓	↓	↓	↓	↓
∞	56.43	8.30	16.47	56.43	8.30	16.47

Tab. 6 Vergleichswerte zur Tab. 5 (Po = Polymerisationsgrad. ∞ entspricht dem Diketopiperazin)

Anmerkung: Die Werte in Tab. 5 sind auf H_2O- und aschefreie Produkte bezogen. Mit steigendem Polymerisationsgrad verändert sich besonders der H- und N-Gehalt nur noch wenig (Tab. 6). Demgegenüber sind die Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode viel zu breit, so dass die H- und N-Prozente nur allgemeine Anhaltspunkte geben. Deshalb wurde meist auf eine N-Bestimmung verzichtet. Dies war umso eher erlaubt, als die Polykondensate vorwiegend aus Amib-Resten aufgebaut sind.

5. Langsames Erhitzen des N-carbonsäureanhydrides. Dazu wurde die Substanz in ein 10cm hohes Schliffgefäss gebracht, dessen Innendurchmesser 0,8 cm betrug. Oben wurde eine Schliffkappe mit Kapillare aufgesetzt, um das entstehende Gas auffangen zu können. Das Schliffgefäss tauchte nur 3cm in einen Heizblock aus Aluminium, damit sich etwa sublimierendes N-carbonsäureanhydrid (1-5mg bei diesen Versuchen) wieder an den oberen Wänden absetzen konnte, so dass deshalb keine Gewichtsverluste eintreten konnten. Für quantitative Gasuntersuchungen wurde ein Schliffgefäss mit seitlich angesetztem Gaseinleitungsrohr benützt und die Luft vor Beginn des Erhitzens durch CO_2 verdrängt.

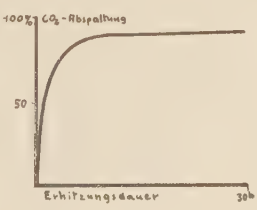
Das N-carbonsäureanhydrid wurde jeweils langsam auf 95-110°C erwärmt und längere Zeit auf dieser Temperatur gehalten. Dabei trübte und verfestigte sich die anfänglich klare Schmelze allmählich. Beim darauffolgenden Erhitzen auf 160° war keine weitere Veränderung zu erkennen (Beim Erhitzen über 160° wurde die Masse gelb bis braun).

Das entwickelte Gas wurde über Hg aufgefangen. Dies gestattete es zu analysieren und die Reaktionsgeschwindigkeit abzuschätzen. Es bestand aus reinem CO_2. Tabelle 7 gibt Auskunft über die Gewichtsabnahme beim Erhitzen.

Tab. 7. Thermische Zersetzung des N-carbonsäureanhydrides der Amib.

Nr.		1	2	3	4
Einwage	g	0.0958	3.15939	0.25479	0.10012
Erhitzungstemperatur	°C	95-140	105-130	105-140	108-125
Erhitzungsdauer	h	28	60	244	125
Polykondensat	g	0.0668	2.19752	0.17581	0.06889
Gewichtsabnahme	g	0.0290	0.96197	0.07898	0.03123
CO_2-Abspaltung (gef./max)	%	88.78	89.30	90.90	91.49
Nr. des Polykondensates in Tab.5			3	2	

Die CO_2-Abspaltung war in den ersten 2 Stunden am grössten und nahm dann rapid ab, wie es nebenstehende graphische Darstellung veranschaulicht.



Sie war weder quantitativ noch, bei gleichen Versuchsbedingungen, stets gleich gross. Im allgemeinen betrug sie 86-94%. Dabei genügte eine Erhitzungsdauer von etwa 40^h; denn nach weiteren 200^h wurden nur noch etwa 1-2% CO_2 erneut abgespalten. Die CO_2-Abspaltung war demnach ebensowenig vollständig wie bei andern N-carbonsäureanhydriden von Aminosäuren (vgl. Tab. 4).

Zur Begründung dieses Verhaltens nahmen verschiedene Forscher an[36-45], dass dies CO_2-Verlusten zuzuschreiben sei, welche vor der Einwage und zwar infolge Zersetzung durch Luftfeuchtigkeit, eingetreten waren. Berechnet man nun für das N-carbonsäureanhydrid der Amib die Elementarzusammensetzung so aus, als ob 10% davon im voraus CO_2 abgespalten und dafür H_2O aufgenommen hätten, so ist der Unterschied gegenüber der unzersetzten Verbindung einzig beim H knapp ausserhalb der Fehlergrenze der Bestimmungsmethode (C um 0,01%, H um 0,32%, N um 0,27% höher, vgl. dazu Tab. 6). Solange demnach der CO_2-Verlust unter 10% ist, wird man auf diese Weise keine genauen Angaben über den Zersetzungsgrad vor der Einwage machen können.

Es gibt aber noch andere Erklärungsweisen für die unvollständige CO_2-Abgabe. Eine davon bestünde in der Sublimationsmöglichkeit des N-carbonsäureanhydrides beim Erhitzen (vgl. Tab. 3), doch handelt es sich dabei nur um unbedeutende Mengen. Ebensowenig kommt in Frage, dass die fest werdende Schmelze unverändertes Ausgangsmaterial einschliesst; denn letzteres ist doch zu unbeständig. Wurde das Polykondensat, um dies zu prüfen, fein pulverisiert und hierauf erneut erhitzt, so war keine vermehrte CO_2-Entwicklung feststellbar (89,3% nach 74^h, 140° / Pulverisieren / 90,9% nach weiteren 170^h, 140°).

Richtiger dürfte folgende Erklärung für die unvollständige CO_2-Abgabe sein: Aus dem sehr unbeständigen N-carbonsäureanhydrid der Aminosäure entstehen beim Erhitzen neben Peptidkondensaten $(R_1R_2{:}C(NH\text{-})CO\text{-})_x$ noch beständigere Peptid-N-carbonsäureanhydride, welche ihr CO_2 nur ganz allmählich abge- Diese Theorie wird einmal gestützt durch die Tatsache, dass die Polykondensa-

te der Tabelle 7 in H_2O-Lösung sauer reagierten (p_H 4.5), wobei das p_H durch kurzes Erhitzen der Lösung nicht gegen 7 verschoben wurde wie beim N-carbonsäureanhydrid der Amib. Ebenso reagierten die Alkohol- oder Essigesterextrakte 3a, bzw. 3c der Tabelle 5 sauer, dagegen die Extraktionsrückstände 3b, 3d neutral. Die leichter löslichen Peptid-N-carbonsäureanhydride waren demnach in den Extrakten angereichert worden. Daher spaltete auch 3a schon beim Erhitzen auf etwas über 100°C CO_2 ab. Eine Zersetzung war dabei umso eher möglich als die Peptid-N-carbonsäureanhydride nicht mehr im Polykondensatgemisch eingeschlossen waren.

Im Sinne der letztgenannten Theorie können auch die gefundenen Elementarzusammensetzungen der Polykondensate*, sowie deren Extraktions-, bzw. Umfällungsprodukte gedeutet werden (vgl. Tab. 5, 6). Bei der vollständigen Abspaltung von CO_2 müssten nämlich Peptide erhalten werden, deren Elementarzusammensetzung dem Diketopiperazin entspräche. Falls nun aber 10% (= die fehlende CO_2-Menge, vgl. Tab. 7) schon vor dem Erhitzen in die Amib umgewandelt worden wären, wie es die zuerst genannte Theorie annimmt, so müsste die Elementarzusammensetzung der Polykondensate lauten: C = 55.44%, H = 8.34%, N = 16.18%. Die gefundenen Werte für Nr 2 und 3 der Tabelle 5 fielen aber nicht nur durch ihren noch geringeren C- und H-Prozentsatz auf, etwa entsprechend einem Tetrapeptid, sondern besonders noch durch den für Peptide zu kleinen H-Gehalt. Einen geringeren H-Gehalt als die reinen Peptide weisen nun aber gerade N-carbonsäureanhydride der Amib-Peptide auf (vgl. Tab. 6). Rechnet man jetzt die Elementarzusammensetzung so aus, als ob neben Peptidkondensaten $\left[(CH_3)_2{:}C(NH{-})CO{-}\right]_n$ noch beispielsweise 20% Tripeptid-N-carbonsäureanhydrid $(CH_3)_2{:}\overline{C\text{-}CO\text{-}NH\text{-}C(CH_3)_2\text{-}CO\text{-}O\text{-}CO\text{-}NH\text{-}C(CH_3)_2\text{-}CO\text{-}NH}$ und 40% Pentapeptid-N-carbonsäureanhydrid vorhanden wäre (wieder entsprechend 10% fehlende CO_2-Abspaltung), so erhält man folgende Zahlen: C = 53.49%, H = 7,84%, N = 15,37%. Diese Zu-

*Sie enthalten nur Amib-Reste, s. später.

sammensetzung könnte ganz gut den erhaltenen Werten von 2 und 3 (Tab. 5) entsprechen.* Die gefundene Elementarzusammensetzung der niedermolekulareren Extraktrückstände 3a und 3c lässt sich ebenfalls zwanglos erklären unter der Annahme eines beträchtlichen Gehaltes an Peptid-N-carbonsäureanhydriden. Bei den Extraktionsrückständen 3b und 3d betrug der Durchschnittspolymerisationsgrad jedenfalls mehr als 9; es konnten daher keine Unterschiede mehr im H-Gehalt gegenüber normalen Peptiden erwartet werden.

Beim Umfällen der Polykondensate aus H_2SO_4 wurden ebenfalls Fraktionen mit verschieden hohem Polymerisationsgrad erhalten (3e-3h der Tab. 5, über deren Aufarbeitung s. später). Hier hatten aber die Fraktionen 3e und 3h mit dem niedersten C-Gehalt einen für Peptide entsprechenden H-Gehalt. Durch die 92°C warme H_2SO_4 waren demnach die Peptid-N-carbonsäureanhydride aufgespalten worden (CO_2 beim Auflösen unter Aufschäumen weg).

Aus dem bisher Gesagten geht hervor, dass beim langsamen, trockenen Erhitzen des Amib-N-carbonsäureanhydrides nur etwa 90% der erwarteten CO_2-Menge abgespalten wird. Von den fehlenden 10% kann vielleicht etwas vor dem Erhitzen abgespalten worden sein (unter H_2O-Aufnahme), doch dürfte die Hauptmenge in den sich bildenden beständigeren Peptid-N-carbonsäureanhydriden enthalten sein. Diese sind der Grund, warum die Elementarzusammensetzung und verschiedene Eigenschaften der Polykondensate nicht allein den reinen Peptiden entsprechen.

Neben den genannten Produkten enthielten die Polykondensate noch geringe Mengen (max. 4%) Diketopiperazin. Sein Nachweis gelang durch ein Anreicherungsverfahren. Beim Neutralisieren mit NH_3 und Verdünnen der H_2SO_4-Lösung des Polykondensates mit H_2O fielen nämlich Diketopiperazinnadeln neben Polypeptiden aus, was durch ein Debye-Scherrer-Diagramm bewiesen werden konnte (Fig. 7, S.

*Eine Zusammensetzg. von 90% Peptidkondensat + 10% N-carbons.anhydr. der Amib würde betragen: C 55.44, H 8.01, N 15.91%. Sie ist aber unwahrscheinlich wegen der leichten Zers. des letzteren. Auch die Röntgendiagramme deuten nicht auf einen Gehalt an dieser Verbindung.

24). Freie Amib konnte in diesen Polykondensaten nicht nachgewiesen werden.

Für die Anwesenheit von Peptiden, sowohl in den ursprünglichen, als auch in den extrahierten und umgefällten Polykondensaten sprachen nicht nur die Elementarzusammensetzungen (Tab. 5), sondern auch die allen gemeinsame Biuretreaktion. Bis letztere positiv wurde, ging es jedoch ungleich lange. Die umgefällten Produkte reagierten sofort positiv, bei den übrigen dauerte es oft mehrere Stunden, entsprechend ihrer schlechten Löslichkeit in H_2O und NaOH. Erstere enthielten neben niedermolekularen Peptid-N-carbonsäureanhydriden eher höhermolekulare Peptide, in den letzteren waren nicht nur die Peptid-N-carbonsäureanhydride zu niedermolekularen Peptiden aufgespalten, sondern auch die Peptide teilweise abgebaut worden.

Ueber andere Reaktionen der Polykondensate sei erwähnt, dass nur die umgefällten mit Alloxan und $HgNO_3$ positiv reagierten. Nur sie gaben mit $CuCO_3$ + Soda rote Farbtöne (nicht blau wie bei der Amib), während die übrigen keine Färbungen zeigten. Dies Verhalten deutete ebenfalls auf einen beträchtlichen Gehalt an niederen Peptiden, welche bei den übrigen Polykondensaten fehlten. Beim Erhitzen sublimierte aus allen ein geringer Teil oberhalb 200°C. Nur bei einem in verdünnter H_2SO_4 unlöslichen Produkt (3g, Tab. 5) war diese Menge grösser und zwar etwa 2/3. Die Sublimate waren weiss. Oberhalb 300° mischten sich dazu noch braune Flüssigkeitströpfchen, während der zurückgebliebene Rest verkohlte.

Endlich wiesen die Debye-Scherrer-Diagramme der Polykondensate 3 deutliche Halos auf (s. Fotometerkurven davon: Figg. 25, 30, bzw. 24 aus Nr 2, bzw. Nr 1 der Tab. 7). Die Interferenzlinien des Amib-N-carbonsäureanhydrides waren also ganz verschwunden und solche von Amib (Fig. 22) traten keine auf.* Die Polykondensate enthielten nur noch äusserst kleine kristallinische Bezir-

*Beim langsamen Erhitzen von älterem N-carbonsäureanhydrid entstanden Polykondensate, deren Röntgendiagramme neben den Polypeptidhalos noch Interferenzlinien der Amib aufwiesen (Fig. 23).

ke, waren also im wesentlichen amorph. Genaue Aussagen über den Polymerisationsgrad können daraus nicht gemacht werden, schon weil Röntgenaufnahmen von reinen Peptiden fehlen. Doch dürfte es sich nicht um sehr niedere Peptide handeln; denn bei diesen wäre eine deutlichere Kristallstruktur zu erwarten (ähnlich etwa den einfachen Glykokollpeptiden[35]). Die 3 Halos wurden schärfer, als die Polykondensate extrahiert worden waren (Fig. 29 aus 3b, Fig. 26 aus 3d der Tab. 5), während die Extraktrückstände (Fig. 28 aus 3a, Fig. 27 aus 3c) breitere Halos aufwiesen. Im ersteren Falle waren die Peptide von Verunreinigungen befreit worden und daher einheitlicher. Beim Umfällen aus H_2SO_4 verloren dagegen die Polykondensate noch kristallinische Bezirke; denn die Halos wurden, je mehr die Peptide wasserlöslich waren, verwaschener (vgl. Fig. 7, ferner Figg. 31, kaum; 32 ziemlich; 33, 34 leicht löslich H_2O).

Röntgenuntersuchungen wurden schon öfters an Peptiden vorgenommen.[33,105,110] Während Aminosäuren[111] und eventuell auch noch niedere Peptide deutliche Interferenzlinien aufwiesen, folglich kristallin waren, gaben synthetische Polypeptide nur wenige, unscharfe Halos[33]. Sie enthielten also nur noch kristallinische Bezirke. Damit glichen ihre Röntgendiagramme schon denjenigen von löslichen Proteinen. Bekanntlich wurden nun die einzelnen Halos, auf Grund von Erfahrungen an Faserproteinen, bestimmten Abständen wie Seitenkettenlänge (innerster Halo), Rückgratdicke (mittlerer), Seitenkettenabstand (äusserster Halo) zugeschrieben. Der Seitenkettenlänge, gemessen quer zur Peptidkette kommt demnach der grösste und dem Seitenkettenabstand, gemessen längs der Peptidkette (= Aminosäurelänge), der kleinste Wert zu. Die Rückgratdicke ist der direkte Abstand zwischen 2 Peptidketten. Sie steht senkrecht auf der Seitenkettenlänge. Vergleicht man nun z.B. die an synthetischen Polypeptiden des Glykokolls ermittelten Abstände mit den entsprechenden von Proteinen, so zeigt sich, dass erstere ebenfalls aus parallelisierten Peptidketten aufgebaut sein dürften. Wenigstens finden so die gemessenen Netzebenenabstände ihre einfachste

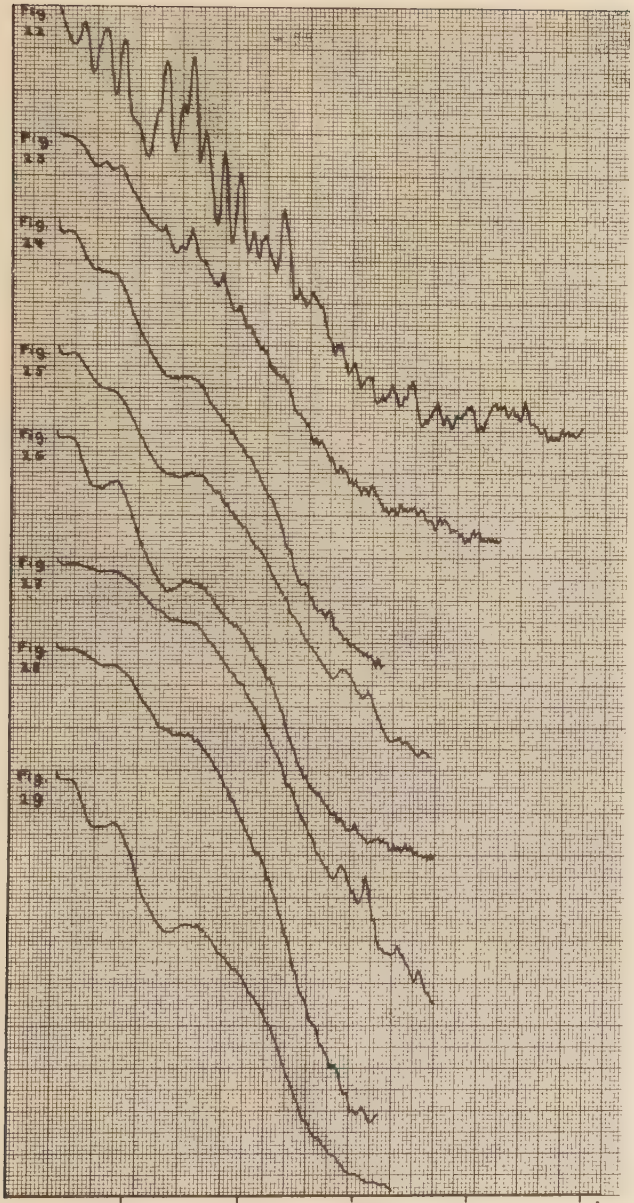
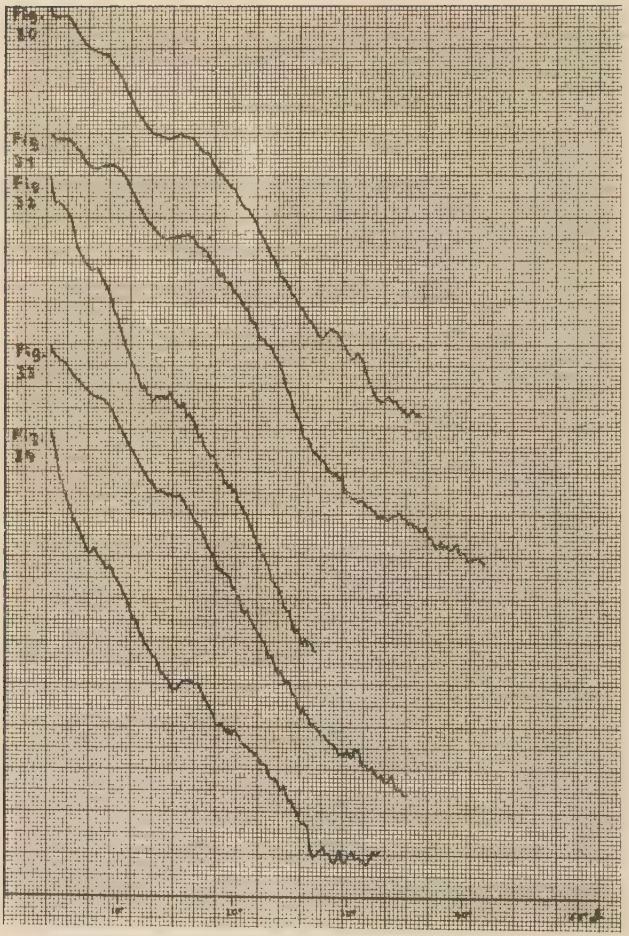


Fig. 12
Fig. 13
Fig. 14
Fig. 15
Fig. 16
Fig. 17
Fig. 18
Fig. 19
10°
20°
30°
40°
50°
θ



Erklärung. Tabelle 8 vermittelt hierzu eine Uebersicht.

Die Röntgendiagramme der Polykondensate aus dem N-carbonsäureanhydrid der Amib waren wegen den ziemlich breiten und unscharfen Halos nicht genau ausmessbar. Daher schwankten die mit Hilfe der Bragg'schen Gleichung errech-

Tab. 8. Netzebenenabstände von Proteinen und Polypeptiden in Å.

Substanz	Seitenkettenlänge	Rückgratdicke	Aminosäurelänge
Faserförmige Proteine[1]	ca 9.5	ca 4.5	ca 3.5
Wasserlösliche " [1]	10 - 11	ca 4.5	ca 3.5
Seidenfibroin[1]			3.5
β-Keratin[1]			3.38
Federkeratin[1]			3.1
Kollagen, Gelatine[1]			2.8
Polyglycin nach Meyer[1]		4.15	3.12
" " " [1]		4.4	3.45
" " Bielser[2]		4.14	3.38
Polyleucin " Go[109] 5)	11	4.8	
Polypeptide der Amib (1-3h, Tab.	7.1- 7.5	4.6-4.8	2.7- 2.8

rechneten Netzebenenabstände (Tab. 8). Im Vergleich zu den Aminosäuren in Proteinen sind hier die Seitenketten kürzer, daher beträgt der Seitenkettenabstand nur 7.2, statt 9-11 Å. Die Rückgratdicke ist dagegen grösser, weil am 2-C-Atom 2 CH_3-Gruppen nebeneinanderliegen. Ferner müssen die Aminosäuren in dieser künstlichen Peptidkette eine ähnliche Schrumpfung aufweisen wie z.B. in Gelatine. Im Vergleich zu den Polyglycinen der Tabelle 8 ist hier die Schrumpfung eher etwas stärker.

6. Hydrolytischer Abbau der Polykondensate von Tabelle 7. Dieser lieferte nur Amib. Wurden nämlich z.B. 0.1g des Polykondensates Nr. 3 der Tabelle 5 im Bombenrohr mit 2ccm konzentrierter HCl 23^h auf 130°C erhitzt, so kristallisierten aus der am Schluss klaren, gelblichen Lösung beim Eindunsten weisse, zerfliessliche Prismen. Diese waren Amib-HCl (0,15g). Sie wurden in H_2O gelöst, mit $AgCO_3$ geschüttelt, das Filtrat davon mit H_2S behandelt, nochmals filtriert und die Lösung eingedunstet. Dabei kristallisierte 0.11g Amib aus.* Es konnten somit 91% der theoretisch zu fordernden Menge gewonnen werden.**

*Ueber deren Nachweis s. Seite 13ff.
**Berechnet als Hydrolyse des polymeren Anhydrides (= Diketopiperazin). Die Amib-Menge muss sich aber verkleinern, wenn im Polykondensat Peptid-N-carbonsäureanhydride oder niedere Peptide enthalten sind.

7. Löslichkeitsverhalten der Polykondensate von Tabelle 7. a.) Erwartungsgemäss zeigten sie dieselben schlechten Löslichkeitseigenschaften wie Polykondensate aus anderen Amino-N-carbonsäureanhydriden. Sogar in gesättigter LiBr- oder $ZnCl_2$-Lösung waren sie unlöslich (in letzterer auch nicht nach 22-tägigem Schütteln). Nur in heisser, konzentrierter HCl lösten sie sich allmählich, in heissem $(CH_3)_2SO_4$ oder in heisser H_2SO_4 innert kurzer Zeit. In der HCl war aber nach erfolgter Lösung Aminosäure durch Hydrolyse entstanden. In der $(CH_3)_2SO_4$-Lösung waren die durch Aetherzusatz wieder fällbaren festen Massen weitgehend verändert, denn sie wurden an der Luft bald flüssig. In konzentrierter H_2SO_4 wurden die Polykondensate bei sehr kurzer Einwirkungszeit weniger verändert. Nachstehend sind solche Lösungsversuche näher beschrieben.

b.) Umfällung der Polykondensate aus konzentrierter H_2SO_4. Dazu wurden die Polykondensate möglichst kurze Zeit mit dem Lösungsmittel erhitzt (vgl. Tab. 9). Dabei löste sich alles unter Aufschäumen. Die Lösung hatte ein gelbliches Aussehen und war bedeutend viskoser als die H_2SO_4. Sie wurde sofort in einer Kältemischung gekühlt und auf die 100-fache Menge Eis getropft (bei Nr. 3 der Tab. 9 direkte Neutralisation mit NH_3 in Kältemischung, dann erst Verdünnen mit H_2O). Dabei entstand ein weisser Niederschlag, der abzentrifugiert und mit H_2O + Aceton gewaschen wurde. Aus dem Filtrat davon schieden sich beim Verdünnen mit Alkohol, Aceton, Butanol oder Alkohol-Aethergemisch keine neuen Niederschläge ab. Nur beim Eindicken eines Filtrates fielen weisse Flitter aus (3g, Tab. 9). Die von den Niederschlägen befreiten Filtrate wurden hierauf mit $Ba(OH)_2$ genau neutralisiert*, vom ausgeschiedenen $BaSO_4$ befreit** und eingedunstet. Dabei entstanden farblose Gallerten, die zuletzt glasige Filme gaben. Beim scharfen Trocknen bildeten sich darin viele Risse und die

*Beim Neutralisieren fiel kein Niederschlag aus, Kontrolle mit NaOH.
**Der $BaSO_4$-Nid. enthielt Peptide; denn mit $CuCO_3$ + Soda entstanden violett gefärbte Cu-Salze.

Tab. 9. Umfällung der Polykondensate aus konzentrierter H_2SO_4

Versuch Nr.		1	2	3
Polykondensat Nr. 2 der Tab. 7	g	0.15840	0.44671	0.93359
zugesetzte konz. H_2SO_4	ccm	1	1	1.5
Lösungstemperatur	°C	250	93	93
Lösungszeit	Min.	5	6	7
Lsg. direkt mit NH_3 neutralisiert in Kälte		-	-	+
Fällung aus Lsg. durch Verd. m. H_2O	g	0.01038	0.00301	0.03562
Ausbeute*	%	6.6	0.67	3.84
Bezeichnung in Tab. 5	Nr.	-	-	3f
enthält Asche	%	n. best.	n. best.	1.63
Fällung beim Eindicken der H_2O-Lösung	g	keine	keine	0.03578
Ausbeute	%	-	-	3.83
Bezeichnung in Tab. 5	Nr.	-	-	3g
enthält Asche	%	-	-	0.77
das lufttrockene Präp. enthält H_2O	%	-	-	14.80
Rückstand nach Neutralis. m. $Ba(OH)_2$**	g	n. best.	0.34260	0.87032
Ausbeute	%	-	76.70	90.86
Bezeichnung in Tab. 5	Nr.	-	3e	3h
enthält Asche***	%	-	3.72	9.61
das lufttrockene Präp. enthält H_2O	%	-	5.74	7.82

Masse zeigte Spannungsdoppelbrechung, welche nach dem Pulverisieren wieder verschwand. Beim Stehen an der Luft verklebten die getrockneten, hornartigen und spröden Klümpchen gegenseitig, indem sie rasch viel H_2O aufnahmen (z.B. nahm Nr. 3g der Tab. 9 innert 6^h 3,6% H_2O auf).

c.) Extraktionen der Polykondensate von Tabelle 7 (Nr. 2). Es war interessant einmal quantitativ zu untersuchen, ob die unlöslichen Polykondensate nach längerer Extraktion mit gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln nicht doch merkbar in Lösung gingen. Das trat auch tatsächlich ein und zwar in beträchtlichem Masse, gemessen am Endresultat, aber nur im geringen Masse, berechnet auf die dazu benötigte Lösungsmittelmenge. Nimmt man nämlich an, dass pro Minute 1ccm Lösungsmittel durch den kleinen Extraktor lief, so brauchte

*% der Einwage. Wegen des Aschegehaltes und der ungleich grossen Peptidadsorption an das ausgefällte $BaSO_4$ brauchte die Ausbeutesumme nicht 100% zu geben.
**Das $(NH_4)_2SO_4$ des Versuches 3 wird dadurch entfernt (NH_3 im Vak. weg).
***Der Aschegehalt war möglich durch: Ba-Salze der Peptide, Adsorption von $Ba(OH)_2$ oder von $BaSO_4$ durch die Peptide, kleiner Ueberschuss von $Ba(OH)_2$ beim Neutralisieren.

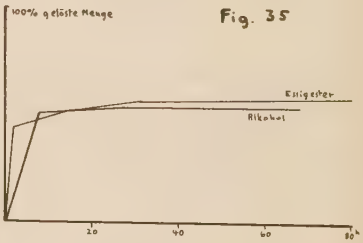
es immerhin in den ersten 8 Stunden rund 500ccm Alkohol, um 0.33g zu lösen (s. Tab. 10 und 11), was einer Löslichkeit von weniger als 1‰ entspricht. Später wurde das Verhältnis der gelösten Substanz zur Lösungsmenge noch ungünstiger, etwa 1:600 000. Dass es sich bei den gelösten Produkten nicht etwa nur um feine Teilchen handelte, die von der Extraktionshülse* einfach durchgelassen worden waren, bewies deren andersartige Elementarzusammensetzung (Tab. 5). Die Extraktionen wurden mit Lösungsmitteln vorgenommen, von denen während der langen Einwirkungszeit keine allzu grossen Zersetzungseinflüsse auf die Polykondensate zu erwarten waren. H_2O eignete sich aus diesem Grunde wenig; dabei hätte auch die schlechte Benetzbarkeit Schwierigkeiten geboten. Eher kam Alkohol in Frage, und zwar 96%iger, weil damit allmählich auch wasserlösliche Anteile extrahiert werden konnten. Weitere Extraktionen wurden mit Essigester, also einem H_2O-freien, organischen Lösungsmittel, ausgeführt, Näheres s. Tab. 10 und 11.

Tab. 10. Extraktionen des Polykondensates Nr. 2, Tab. 7. Gelöste Mengen/Zeit.

In Alkohol lösten sich von 0.65676g			In Essigester lösten sich von 0.19705g		
0.33336g	nach	8 h	0.08748g	nach	2 h
0.01300	in weiteren	10 h	0.01207	in weiteren	9 h
0.00555	" "	10 h	0.00410	" "	5 h
0.00180	" "	10 h	0.01040	" "	17 h
0.00165	" "	10 h	0.00132	" "	47 h
0.00135	" "	10 h			
0.00105	" "	10 h			
0.35776g	nach total	68 h	0.11537g	nach total	80 h

Trägt man die Werte der Tabelle 10 graphisch auf, so erkennt man auch hier, dass die Polykondensate nicht einheitlich zusammengesetzt sind. Daher die Knicke im Kurvenverlauf (vgl. dazu Seite 50ff).**

Fig. 35



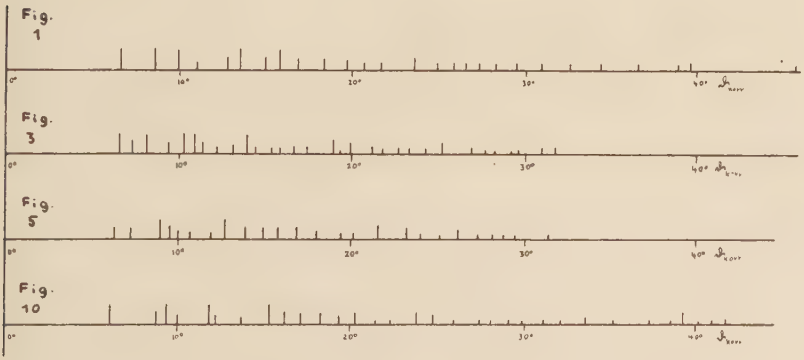
*Nr. 603 von Schleicher und Schüll.
**s. Fig. 35.

Tab. 11. Extraktionen von Polykondensaten. Zusammenfassung.

Herkunft des Polykondensates		wie Anm. S. 53	Nr. 2 Tab. 7	Nr 2 Tab. 7
Einwage	mg	85,23	656,76	197,05
Extraktion mit		Alkohol	Alkohol	Essigester
Extraktionsdauer	h	70	68	80
Gelöste Menge	mg	40,79	357,76	115,37
	%	47,68	54,48	58,55
Bezeichnung in Tab. 5	Nr.	-	3a	3c
Extraktionsrückstand	mg	44,44	299,00	81,68
	%	52,14	45,52	41,45
Bezeichnung in Tab. 5	Nr.	-	3b	3d

R O E N T G E N U N T E R S U C H U N G E N .

Für Debye-Scherrer-Aufnahmen wurden die Substanzen in einer Kamera von 180 mm Umfang mit Cu K_α-Strahlung (1.539 Å) belichtet. Nachstehend sind die Diagramme der Amib (Fig. 1), ihrer N-carbomethoxyverbindung (Fig. 3), ihres N-carbonsäureanhydrides (Fig. 5) und ihres Diketopiperazines (Fig. 10) aufgezeichnet.



Z U S A M M E N F A S S U N G .

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft ob und unter welchen Bedingungen die 2-Aminoisobuttersäure, bzw. einige ihrer Derivate, zu Peptiden polykondensierbar sind. Dabei konnte folgendes festgestellt werden:

1. Die Amib selbst wurde durch Erhitzen kaum angegriffen, auch nicht nach Zusatz von Glyzerin u.a. Substanzen. Unter den gleichen Bedingungen sind dagegen aus Glykokoll schon Peptide erhältlich. Hier bildete sich höchstens Diketopiperazin als Kondensat.

2. Mit Essigsäureanhydrid bildeten sich aus Amib nur niedere azetylierte Peptide, die schon beim Kochen mit H_2O wieder aufgespalten wurden.

3. Aus dem Aethylester oder dem N-carbomethoxyderivat gelang keine Direktsynthese von Peptiden.

4. Hingegen reagierte das bisher unbekannte N-carbonsäureanhydrid der Amib analog wie schon bekannte Homologe. Auf Anhieb wurden Polypeptide erhalten. Diese erwiesen sich bei näherer Untersuchung als ein Gemisch von Peptiden mit Peptid-N-carbonsäureanhydriden. Letztere wurden zum ersten Mal bei dieser Polykondensationsart festgestellt. Infolge der Unlöslichkeit der gewonnenen Produkte musste auch hier auf eine Molekulargewichtsbestimmung verzichtet werden. Sie liessen sich nämlich nur aus konzentrierter H_2SO_4 unter teilweiser Aufspaltung umfällen.

5. Die Resistenz der Amib gegenüber den angewandten Reagentien und Temperaturen kann den beiden Methylgruppen am 2-C-Atom zugeschrieben werden. Deshalb kommt sie wahrscheinlich auch nicht in Eiweisstoffen vor. Im Zusammenhang damit steht der Befund, dass sie, wenigstens für Penicillum glaucum, nicht als alleinige N-Quelle genügt.

L I T E R A T U R .

1. Fodor, die Grundlagen der Dispersiodchemie, Steinkopf 1925
2. T. Svedberg, K. Pedersen, die Ultrazentrifuge, Steinkopf 1940
3. F. Halle, Koll. Z. 81 334 (1937)/ H. Mark, H. Philipp, Naturw. 25 119 (1937) / W. Astbury, Koll. Z. 82 130 (1938) / D. Krüger, Ch. Ztg. 62 535 (1938) / ferner: J. Bernal, J. chim. phys. 35 179 (1938) / K. Felix, Chemie und Physiologie des Eiweisses, Steinkopf 1938 / L. Zechmeister, Fortschritte der Chemie org. Naturstoffe Bd. I S. 314ff/ T. Svedberg, Ind. eng. chem. anal. ed. 10 113 (1938). E. Husemann, Naturw. 29 257 (1941)
4. Diss. H. Mosimann, Bern 1937
5. Diss. M. Bielser, Bern 1939
6. Th. Curtius, J. pr. Ch. (2) 24 239 (1881)
7. E. Fischer, Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide u. Proteine, Springer 1906 / E. Stiasny, H. Scotti, B 63 2977 (1930) / E. Fischer, B 40 1754 (1907), 46 3253 (1913), 52 809 (1918)
8. E. Abderhalden, A. Fodor, B 49 561 (1916)
9. M. Bergmann, F. Stern, A 448 20 (1926) / M. Bergmann, E. Kann, A. Miekely A 449 135 (1926) / M. Bergmann, F. Stern, Ch. Witte, A 449 277 (1926) / M. Bergmann, L. Zervas, B 65 1192 (1932) / Schönheimer, H 154 203 (1926)/ M. Bergmann, L. Zervas, J. biol. Ch. 124 1 (1938), 119 707 (1937) / E. Abderhalden, Fermentforsch. 1 47 (1914) / Zusammenfassung: H. Wasteneys, H. Borsock, Physiol. Rev. 10 100 (1930)
10. E. Dreher, Zur Chemie der Kunststoffe, 1939
11. L. Balbiano, Trasciati, B 33 2323 (1900), 34 1503 (1901)
12. F. Wessely, H 146 80 (1925)
13. L. Maillard, Ann. de Chim. et Phys. (9) 1 519 (1914), C. r. 153 1078 (11)
14. Blanchtière, Bull. Soc. chim. 31 1045 (1922), 35 1317 (1924)
15. A. Kohler, A. 134 367 / J. Pr[illegible] A. 134 372
16. E. Schaal, A. 157 26 (1871)
17. H. Schiff, A 303 183 (1898)
18. F. Knoop, J. Blanko, H 146 273 (1925) / E. Mohr, F. Strohschein, J. pr. Ch. 81 60 (1910)
19. s. 9c
20. E. Mohr, Th. Geis, J. pr. Ch. 81 55 (1910)
21. P. Levene, R. Steiger, J. biol. Ch. 93 581 (1931)
22. R. Steiger, Helv. 17 555 (1934)
23. M. Bergmann, L. Zervas, H 175 154 (1928)
24. Th. Curtius, J. pr. Ch. 26 203 / B 17 756 (1883)
25. M. Bergmann, A. Miekely, E. Kann, A 445 17 (1925) / M. Bergmann, Angew. Ch. 41 112 (1928)
26. Th. Curtius, B 16 753 (1883)
27. L. Lilienfeld, Arch. anat. physiol. Path. 383 555 (1894)
28. M. Schwarzschild, Beitr. chem. physiol. Path. 4 155 (1904)
29. Th. Curtius, B 37 1284 (1904)
30. M. Frankel, E. Katkalski, Nature (L) 144 330 (1939)
31. Th. Curtius, F. Goebel, J. pr. Ch. (2) 37 150, 171 (1888)
32. E. Pascu, Nature (L) 144 551 (1939)
33. K. H. Meyer, Y. Go, Helv. 17 1488 (1934)
34. s. 7a
35. M. Frankel, O. Neufeld, E. Katkalsky, Nature (L) 144 832 (1939)
36. H. Leuchs, B 39 857 (1906)
37. H. Leuchs, Manasse, B 40 3243 (1907)
38. H. Leuchs, Geiger, B 41 1721 (1908)
39. Th. Curtius, Sieber, B 54 1430 (1921), 55 1557 (1922)

40. F. Sigmund, F. Wessely, H 157 91 (1926)
41. F. Wessely, F. Sigmund, H 159 102 (1926)
42. F. Wessely, M. John, Mh Ch. 48 1 (1927)
43. " " , H 170 38 (1927)
44. " " , H 170 167 (1927)
45. " , E. Kemm, J. Mayer, H 180 64 (1929)
46. K. Freudenberg, G. Piazda, C. Kovõnagel, A 537 197 (1939)
47. E. Abderhalden, Zeissert, Fermentforschung 13 310 (1932)
48. Bucherer, Steiner, J. pr. Ch. 140 291 (1934)
49. E. Grimaux, Bull. Soc. chim. (2) 38 64 (1882)
50. H. Schiff, A 310 301 (1899)
51. P. Schützenberger, C. r. 112 198 (1891)
52. M. Nencki, B 28 560 (1895) / E. Hart, H 33 347 (1901) / O. Fuerth, H. Schneider, Beitr. chem. physiol. Pathol. 1 229 (1901)
53. C. Enders, Koll. Z. 85 74 (1938)
54. R. Engeland, B 42 2962 (1909)
55. A. Fodor, Ch. Epstein, H 171 222 (1927) / Bioch. Z. 200 211 (1928)
56. A. Fodor, Bioch. Z. 228 315 (1930)
57. C. Vögtlin, C I 34 1076
58. H. Strain, K. Linderström-Lang, C I 39 1577, 3198
59. vgl. E. Abderhalden, H. Chang, E. Wurm, H 72 24 (1911) (1875)
60. M. Schützenberger, Bull. soc. chim. 23 161,193,216, 242,385,433; 24 2,145
61. E. Fischer, A. Skita, B 33 177 (1901) / E. Fischer, P. Levene, R. Aders, H 35 70 (1902)
62. C. Neuberg, F. Blumenthal, Hofmeisters Beitr. 2 238 (1902) / Deutsche med. Wchschr. 1901 Seite 6
63. A. Orgler, Hofmeisters Beitr. 1 583 (1902)
64. H. Franzen, Sitzungsber. Heidelberg 1910
65. C. Mörner, H 98 92 (1916), / S. Schryrer, H. Buston, Proc. roy. Soc. Lond. B 99 476 (1926), 100 360 (1926)
66. F. Foremann, Bioch. Z. 56 1 (1913)
67. T. Yabuta, Z. Saito, K. Taketla, K. Tamari, Sci. Pap. Inst. phys. chem. Res. 35 Nr. 860, 871 / Bull. Inst. phys. chem. Res. (Abstr.) 17 61 (1938)
68. J. Meisenheimer, Wochenschr. f. Brauerei 32 325 (1915)
69. E. Abderhalden, Weil, H 88 275 (1913)
70. S. Oikawa, Jap. J. med. sci. trans. Bioch. 1 61 (1925)
71. Negelein, Bioch. Z 142 496 (1923) / Wieland, Bergel, A 439 203 (1924)
72. E. Mohr, J. pr. Ch. (2) 81 477, 497 (1910)
73. E. Mohr, Th. Geis, J. pr. Ch. (2) 81 49 (1910)
74. A. Fodor, Ch. Epstein, Bioch. Z 210 33 (1929), 259 331 (1933) / W. Astbury, W. Sisson, Proc. roy. Soc. Lond. (A) 150 533 (1935) / T. Svedberg, Nature (Suppl.) 139 1051 (1937), Chem. Rev. 20 81 (1936)
75. O. Olsen, C. Prausnitz, Bakteriolog. Taschenbuch, Leipzig 1931
76. N. Zelinsky, G. Stadnikow, B 39 1726 (1906)
77. H. Benedikt, J. am. chem. Soc. 51 2277 (1929)
78. Haushofer, J. 1881 705
79. H. Jesserer, F. Lieben, Bioch. Z 292 403 (1937) / W. Traube, G. Glaubitt, B 63 2094 (1930) / F. Lieben, H. Jesserer, Bioch. Z 285 36 (1936); Nature (L) 142 463 (1938) / P. Pfeiffer, W. Christeleit, H. 245 197 (1937) / J. Sizer, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 37 107 (1937)
80. Strecker, A 123 363 (1862)
81. G. Wocker, Helv. 20 1260 (1937)
82. E. Abderhalden, H 252 81 (1938)
83. Heilpern, Mh. Ch. 17 242 (1896)
84. N. Zelinsky, J. Kulikow, H 73 461 (1911) / E. Abderhalden, Weil, H 81 226 (1912)
85. E. Fischer, B 34 443 (1901)

86. E. Fischer, B 39 530 (1906)
87. F. Feigl, V. Anger, O. Frehden, Mikrochim. 15 12 (1934)
88. Franchimont, Friedmann, R. 27 202 (1908) / E. Abderhalden. E. Rosner, H 163 149 (1927) / J. Dubsky, W. Wensink, B 49 1135 (1916) / S. Ishikawa, C II 29 191 / Rosenmund, B 42 4473 (1909) / J. Thiele, K. Heusser, A. 290 28 (1896) / Gabriel, B 44 59 (Anmerkg. 3) (1911) / vgl. a. Beilstein Handb.
89. Rosenmund, B 42 4473 (1909)
90. Eigene Versuche
91. s. 88g
92. s. 88b
93. Vgl. W. Bryant, D. Smith, J. am. chem. Soc. 58 1014 (1936)
94. E. Fischer, Raske, B 39 3984 (1906)
95. E. Abderhalden, Gebelein, H 152 88, 125)1926)
96. J. Thiele, K. Heusser, A 290 28 (1896)
97. s. 88c
98. L. Kellner, Nature (L) 140 193 (1937)
99. E. Fischer, B 38 607; 39 559 (1906)
100. S. Ishikawa, C II 29 191
101. W. Carothers, A. Pat. 2071253; C I 37 3873
102. Tiemann, Friedländer, B 14 1979 / Limpricht, A 101 297 / C. Bischoff, B 22 1786, 1792 (1889)
103. A. Tschitschibabin, J pr. Ch. (2) 107 109, 122 (1924)
104. N. Gawrilow, N. Blaguina, N. Dondykina, J. Kornilow, Bull. soc. chim. 5 442 (1938) / ferner E. Abderhalden, E. Komm, H 140 100 (1924)
105. A. Christomanos, Praktika, 11 211 (1936)
106. G. Klein, M. Steiner, Jahrb. f. wiss. Botanik 68 602 (1928) / M. Steiner, H. Löffler, Jahrb. f. wiss. Botanik, 71 463 (1929)
107. K. Landsteiner, E. Prasek, Bioch. Z. 74 388 (1916); 58 362 (1914)
108. A. Docking, E. Heymann, J. physic. Chem. 43 513 (1939) / Y. Go, H. Tani, Bull. chem. Soc. Jap. 14 510 (1939) / ferner Nr. 12, 33, 36-46
109. s. 108b
110. F. Lenel, Naturw. 19 19 (1931)
111. D. Drowfoot, Nature (L) 135 591 (1935) / J. Hengenberg, F. Lenel, Z Kristallogr. 77 424 (1931) / A. Kitaygorodski, Acta physicochim. URSS 5 749 (1936) / J. Bernal, Z Kristallogr. 78 363 (1931) / G. Albrecht, R. Corey, J. am. chem. Soc. 61 1087 (1939)

C U R R I C U L U M V I T A E .

****

Ich wurde am 4. 10. 1912 in Bümpliz geboren. Nach dem Besuch der Primar- und der Städtischen Mittelschulen in Bern absolvierte ich 1932 die Maturität. Anschliessend begann ich mein Chemiestudium an der Universität Bern. Vom Herbst 1937 bis April 1939 war ich Volontär- und von da an bis April 1940 Assistent am Organisch- Chemischen Institut der Universität Bern.

Photomechanische Reproduktion Schüler A. G. Biel · 1941